

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE PAR PYROSÉQUENÇAGE DE DÉTECTION ET
DE QUANTIFICATION DES MUTATIONS LIÉES À LA RÉSISTANCE AU
BOSCALIDE CHEZ *BOTRYTIS CINEREA*

par

Mélanie Gobeil-Richard

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître (ès) en sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 2014

Le 26 août 2014

*le jury a accepté le mémoire de Madame Mélanie Gobeil-Richard
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Carole Beaulieu
Directrice de recherche
Département de biologie

Chercheure Odile Carisse
Codirectrice de recherche
Agriculture et Agroalimentaire Canada

Professeur Kamal Bouarab
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Nathalie Beaudoin
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Botrytis cinerea Pers., [forme imparfaite du *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.] est le champignon ascomycète responsable de la pourriture grise (moisissure grise, pourriture de la grappe) chez des centaines de plantes hôtes au niveau mondial. Il est considéré comme un agent pathogène à haut risque de développement de résistance aux fongicides et s'attaque aux fruits, aux légumes mais, aussi aux plantes ornementales. Afin de lutter contre les maladies causées par *B. cinerea*, plusieurs familles de fongicides de synthèse sont homologuées au Canada. Un des fongicides récemment introduit et fréquemment utilisé est le boscalide. L'utilisation du boscalide combiné à la pression de sélection a mené au développement de la résistance dans les populations de *B. cinerea*. La génétique des mécanismes de résistance étant de plus en plus documentée, plusieurs mutations responsables de la résistance au boscalide ont été identifiées sur le gène de la sous-unité B de la succinate déshydrogénase (SdhB). Des substitutions d'acides aminés provoqués par des polymorphismes nucléotidiques (SNP) sont associées à cette résistance. Les mutations les plus fréquentes retrouvées chez les individus résistants sont la substitution d'une histidine par une tyrosine (H272Y), par une arginine (H272R), ou par une leucine (H272L) au codon 272 de la sous-unité SdhB. De plus, sur le codon 225, une proline est substituée par une phénylalanine (P225F) et sur le codon 230, une asparagine est substituée par une isoleucine (N230I). Il existe des outils moléculaires pour détecter les mutations H272Y, H272R, H272L, P225F et N230I, mais ils ne permettent pas d'analyses quantitatives et leur précision est limitée. Il devient donc important de développer une méthode efficace permettant de détecter et quantifier simultanément les mutations liées à la résistance au boscalide.

L'objectif du travail était donc de développer un nouvel outil de détection et de quantification des mutations reliées à la résistance au boscalide chez *B. cinerea*. À l'aide d'une banque d'individus de *B. cinerea* déjà caractérisés pour la présence des cinq mutations (P225F, N230I, H272L, H272Y et H272R) et caractérisés pour la résistance au boscalide, un nouvel essai de pyroséquençage a été mis au point sur plateforme PyroMark Q24 (Qiagen).

L'utilisation du PyroMark Q24 comme outil de détection et de quantification de cinq mutations reliées à la résistance au boscalide a permis de repousser les limites des techniques existantes. La technique est basée sur le séquençage par synthèse générant des données quantitatives avec une précision de 5%. Les résultats ont démontré une relation linéaire ($R^2=0,99$) entre les ratios (0% à 100%) de spores d'individus résistants et sensibles connus et prédit avec le PyroMark Q24. Le pyroséquençage est une technologie prometteuse puisqu'elle favorisera l'étude populationnelle en offrant la possibilité de combiner les échantillons et permettra ainsi d'analyser un grand nombre d'échantillons plus rapidement, avec une meilleure précision que les technologies de détection actuelles. La disponibilité d'informations quantitatives sur la proportion de chacune des mutations présentes dans une population permettra l'amélioration de la compréhension et de la gestion face à la résistance aux fongicides au sein de la communauté agricole.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, pyroséquençage, résistance, fongicides, mutations

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout d'abord mes directrices de recherche Carole Beaulieu et Odile Carisse d'avoir cru en moi dès le début, de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de faire ce projet de maîtrise. Je les remercie pour leurs supports et conseils tout au long de ces deux années. Merci aussi à mes deux conseillers Nathalie Beaudoin et Kamal Bouarab d'avoir pris part à ce projet.

Je voudrais surtout dire un grand MERCI à Mathieu Tremblay d'avoir été là. Je te remercie pour tous les précieux conseils que tu m'as donnés, toutes les heures que tu as passées avec moi sans compter, toutes les discussions qu'on a eues qui m'ont fait réfléchir, mais aussi les autres qui m'ont fait rire. Je te remercie pour tous les encouragements. J'ai beaucoup appris en 2 ans grâce à toi et j'espère qu'on continuera à se côtoyer!!

Je remercie aussi les membres du labo Annie, Audrey, Mamadou et Brahim, mais aussi Hervé pour leurs conseils tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais aussi remercier ma mère de m'avoir toujours encouragée dans tout ce que j'entreprends. Je remercie aussi Marc-André pour son soutien, ses encouragements et son amour. Je remercie aussi mes amies de m'avoir écoutée, conseillée, mais surtout de m'avoir permis de me changer les idées durant nos fins de semaine de filles!

Enfin, j'aimerais remercier Agriculture et Agroalimentaire Canada et Phytodata Inc. d'avoir fourni le financement nécessaire à la réalisation du projet.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xiii
 CHAPITRE 1 INTRODUCTION	 12
PRÉAMBULE	12
1.1 <i>BOTRYTIS CINEREA</i> , AGENT PATHOGÈNE DE LA POURRITURE GRISE	13
1.1.1 Description morphologique	13
1.1.2 Cycle infectieux de <i>Botrytis cinerea</i>	15
1.1.3 Symptômes	17
1.2 LUTTE CONTRE LA POURRITURE GRISE	17
1.2.1 Lutte chimique	18
1.2.2 Fongicides affectant la respiration	19
1.3 PHÉNOMÈNE DE RÉSISTANCE	23
1.3.1 Mécanismes de résistance chez <i>Botrytis cinerea</i>	23
1.4 OUTILS DE DÉTECTION DE LA RÉSISTANCE AUX FONGICIDES CHEZ <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	26

1.4.1 Méthodes conventionnelles.....	26
1.4.2 Méthodes moléculaires.....	27
1.4.2.1 PCR-RFLP.....	28
1.4.2.2 PCR allèle spécifique.....	29
1.4.2.3 PCR quantitatif (PCR en temps réel).....	29
1.5 PYROSÉQUENÇAGE.....	31
1.5.1 Principe du pyroséquençage.....	31
1.6 OBJECTIFS DU PROJET DE MAÎTRISE.....	34
 CHAPITRE 2 A NEW METHOD TO QUANTIFY MUTATIONS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO SDHI-FUNGICIDES IN <i>BOTRYTIS</i> SPP. MIXED POPULATION.....	36
PRÉAMBULE.....	36
MANUSCRIT.....	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUCTION.....	40
2 MATERIALS AND METHODS	43
2.1 <i>Botrytis cinerea</i> strains and cultures.....	43
2.2 DNA extraction.....	44
2.2.1 DNA extraction from mycelium.....	44
2.2.2 DNA extraction from spores.....	44

2.3 PCR and pyrosequencing design.....	45
2.4 Pyrosequencing.....	45
2.5 DNA mixtures for pyrosequencing analysis.....	46
2.6 Spore mixtures for pyrosequencing analysis.....	46
2.7 Sensitivity of the <i>B. cinerea</i> SDHIs PyroMark Q24 assay.....	47
2.8 Specificity of the <i>B. cinerea</i> SDHIs PyroMark Q24 assay.....	47
2.9 Statistical analysis.....	48
3 RESULTS	48
3.1 Detection and quantification of SDHI mutations by pyrosequencing.....	48
3.2 Sensitivity assay.....	51
3.3 Specificity assay.....	53
4 DISCUSSION	53
ACKNOWLEDGMENTS	57
REFERENCES	57
CHAPITRE 3 CONCLUSION GÉNÉRALE.....	63
BIBLIOGRAPHIE.....	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Unité de mesure

°C	degré Celsius
%	pourcentage
bp	«base pair»
EC ₅₀	concentration efficace médiane
h	heure
l	litre
mg	milligramme
mM	millimolaire
ml	millilitre
ng	nanogramme
pb	paire de bases
R^2	coefficient de détermination
µg	microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre
µM	micromolaire

Milieux de culture

PDA	«potato dextrose agar»
-----	------------------------

Autres

ADN	acide désoxyribonucléique
APS	adénosine 5' phosphosulfate
AQ	allèle quantification
ATP	adénosine triphosphate
CCD	dispositif de couplage de charge
CLS-Y	«fungi lysis buffer solution»
dNTPs	désoxyribonucléotides
DNA	«deoxyribonucleic acid»
dTTP	désoxythymidine triphosphate
FAD	flavine adénine dinucléotide
Fp	flavoprotéine
FR	facteur de résistance
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
Ip	protéine fer-soufre 80
ISDH	inhibiteur de la succinate déshydrogénase
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PCR-RFLP	réaction en chaîne par polymérase de polymorphisme de restriction
PIRA-PCR	«primer-introduced restriction analysis»
PPi	pyrophosphate
PPS	«protein precipitate solution»
QoIs	inhibiteurs du coenzyme Q
RF	«Resistance factor»

SDH	succinate déshydrogénase
SDHIs	inhibiteurs de la succinate déshydrogénase
SdhA	succinate déshydrogénase sous-unité A
SdhB	succinate déshydrogénase sous-unité B
SdhC	succinate déshydrogénase sous-unité C
SdhD	succinate déshydrogénase sous-unité D
SNP	polymorphisme mononucléotidique
TCA	cycle de l'acide tricarboxylique
UV	ultra violet

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

1. Classement des ingrédients actifs inhibant le complexe de la succinate déshydrogénase.....20

CHAPITRE 2

1. Determination of limit of detection of PyroMark Q24 using 100% of H272L mutation in AQ mode.....52
2. Specificity of F481/H272R1b primers.....54

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

1. Cycle de développement de la pourriture grise chez <i>Botrytis cinerea</i>	16
2. Sites d'action des fongicides chez <i>Botrytis cinerea</i>	19
3. Complexe de la succinate déshydrogénase	21
4. Structure chimique du boscalide.....	22
5. Principe du pyroséquençage.....	33

CHAPITRE 2

1. Relationship between known % of Wild Type (WT), H272R, H272Y, H272L, N230I and P225F of <i>Botrytis cinerea</i> PCR products and estimated % by pyrosequencing.....	49
2. Relationship between known % of Wild Type (WT), H272R, H272Y, H272L, N230I and P225F of <i>Botrytis cinerea</i> spores and estimated % by pyrosequencing.....	51

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

PRÉAMBULE

Le monde végétal est constamment confronté à différentes maladies, dont les principaux agents causals sont les champignons, les bactéries et les virus. Que ce soit les fruits, les légumes ou les plantes ornementales, chacun d'entre eux peut se voir à un moment ou l'autre confronter à l'un de ces agents pathogènes. Malheureusement, les végétaux ne possèdent pas toujours les mécanismes de défense nécessaires pour arriver à se débarrasser de ces organismes phytopathogènes. Un des envahisseurs majeurs classé deuxième en importance au niveau mondiale, basé sur l'importance scientifique et économique et causant une des maladies les plus importantes, est le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* (Dean *et al.*, 2012 ; Veloukas *et al.*, 2011). Cet agent pathogène causant la maladie de la pourriture grise chez des centaines de plantes hôtes, engendre des pertes économiques et agricoles importantes dans plusieurs types de culture (Veloukas *et al.*, 2011). Pour l'industrie agricole et agroalimentaire, s'adapter et tenter de gérer tous ces envahisseurs peut devenir un lourd fardeau. Heureusement, plusieurs méthodes sont disponibles afin de réduire les dommages engendrés par ces agents phytopathogènes.

Aujourd'hui, la lutte contre les champignons phytopathogènes comme *B. cinerea*, repose essentiellement sur les méthodes chimiques telle l'utilisation de fongicides. Depuis les années 1950, plusieurs de ces fongicides de synthèse ont d'ailleurs été utilisés de façon intensive (Leroux *et al.*, 2010). Cette utilisation abusive a engendré l'apparition d'individus résistants dans les différentes populations de champignons phytopathogènes. De nos jours, la résistance aux fongicides prend de plus en plus d'ampleur au niveau mondial. Chez *B.*

cinerea, plusieurs types de résistance à différents fongicides, comme le boscalide, ont été découverts et étudiés (Avenot et Michailides, 2010 ; Leroux *et al.*, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011). Afin d'étudier le développement accéléré de la résistance aux fongicides et d'améliorer nos connaissances sur le sujet, il devient donc important d'avoir des méthodes d'études au niveau moléculaire rapides et efficaces.

1.1 *Botrytis cinerea*, agent pathogène de la pourriture grise

Botrytis cinerea Pers. [forme imparfaite (anamorphe) du *Botrytis fuckeliana* (de Bary) Whetzel.] est le champignon ascomycète responsable de la pourriture grise (moisissure grise, pourriture de la grappe) chez des centaines de plantes hôtes au niveau mondial. Il s'attaque aux fruits (ex. raisin, fraise) et aux légumes (ex. tomate, laitue) de diverses productions végétales, mais aussi aux plantes ornementales (ex. tournesol, rose) (Kim et Xiao, 2011 ; Leroux *et al.*, 2002 ; Veloukas *et al.*, 2011 ; Yin *et al.*, 2011). Ce champignon phytopathogène peut, selon le cas, entraîner la destruction totale ou partielle de la plante hôte ou même de la récolte engendrant des pertes économiques pré- et post-récolte importantes (Fernandez-Ortuño *et al.*, 2012). En plus d'être considéré comme un champignon nécrotrophe, *B. cinerea* se caractérise principalement par son ubiquité, son saprophytisme, sa grande variabilité génétique et sa capacité de s'adapter facilement à son environnement (De Miccolis Angelini *et al.*, 2010 ; Kretschmer et Hahn, 2008 ; Martinez *et al.*, 2005). Cette facilité d'adaptation pourrait être un facteur majeur dans le développement de la résistance aux fongicides. Certains suggèrent que cette capacité d'adaptation, résulte entre autres d'un cycle de vie très court ainsi que d'une reproduction prolifique (Brent et Hollomon, 2007 ; Yin *et al.*, 2011).

1.1.1 Description morphologique

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* peut se présenter ou survivre sous différentes formes telles que le sclérote, le mycélium, les macroconidies, les microconidies et les ascospores.

Le sclérote : Il se développe dans les tissus morts de son hôte et est considéré comme la principale structure de survie du champignon durant l'hiver (Williamson *et al.*, 2007). Il est formé par une masse mycélienne dense plutôt arrondie, entouré d'un cortex rigide contenant des pigments de mélanine. Ces caractéristiques le protègent de la dessiccation, des rayons ultra-violet et des attaques de microorganismes sur de longues périodes (williamson *et al.*, 2007).

Le mycélium : Il est aussi une structure qui peut survivre dans les tissus morts de son hôte et est constitué d'hyphes septés et perforés d'un pore central. Il comprend des filaments articulés, grisâtres ou olivâtres, cylindriques, quelquefois vésiculeux au niveau de la cloison médiane, dont le diamètre varie considérablement suivant les conditions de développement des hyphes (Ajouz, 2009).

Les macroconidies : Elles ont la particularité d'être des cellules uniques, multi-nucléées, différenciées (stade final de développement) et au stade de dormance (fonctionnement du métabolisme limité pour sa survie) (Agrios, 2005). Le fait que les macroconidies possèdent la caractéristique d'être hétérocaryotiques est très avantageux. Cette caractéristique confère au champignon *B. cinerea* une plus grande variabilité génétique et donc, la possibilité de s'adapter plus rapidement aux conditions du milieu, par exemple aux fongicides (Williamson *et al.*, 2007 ; Leroux, 2004).

Les microconidies (spermaties) : Ce sont des gamètes mâles uninucléés jouant un rôle dans la reproduction sexuée du champignon.

Les ascospores : Au nombre de huit par asque, elles sont oblongues à elliptiques. Un asque contient huit ascospores binucléés qui germeront pour produire un mycélium (Williamson *et al.*, 2007). Les asques sont produites sur des apothécies, fructifications d'ascomycètes assurant la reproduction sexuée.

1.1.2 Cycle infectieux de *B. cinerea*

Botrytis cinerea possède un cycle infectieux sexué et asexué. Il peut produire soit des spores asexuées (macroconidies) ou sexuées (microconidies), soit du mycélium ou des sclérotés (Ajouz, 2009). Durant l'hiver, *B. cinerea* se conserve principalement sous forme de sclérotés dans les débris morts de l'hôte, la plupart du temps les feuilles tombées au sol. Lorsque les conditions de température et d'humidité redeviennent favorables à la végétation, les sclérotés germent et produisent un mycélium qui, grâce à ses appressoria, perforera la cuticule végétale. Il y aura par la suite, développement des conidiophores portant des macroconidies (spores asexuées) qui serviront d'inoculum primaire (Figure 1). Les macroconidies libérées seront principalement propagées à l'aide du vent et de la pluie, ce qui sera considéré d'inoculum secondaire. Le mycélium de *B. cinerea* peut aussi se conserver dans les débris de l'hôte durant l'hiver pour par la suite produire des conidies et servir d'inoculum primaire (Figure 1) (Williamson *et al.*, 2007). Pour plusieurs fruits et légumes (ex. courgette, fraise, pomme), l'infection commence généralement sur les fleurs sénescents puis se propage sur les fruits adjacents en développement (Williamson *et al.*, 2007). L'infection par *B. cinerea* peut aussi être favorisée par des blessures sur les fruits ou les feuilles (Elmer et Michailides, 2004). De plus, *B. cinerea* peut, selon les conditions environnementales, effectuer plusieurs cycles de reproduction asexuée au cours d'une saison.

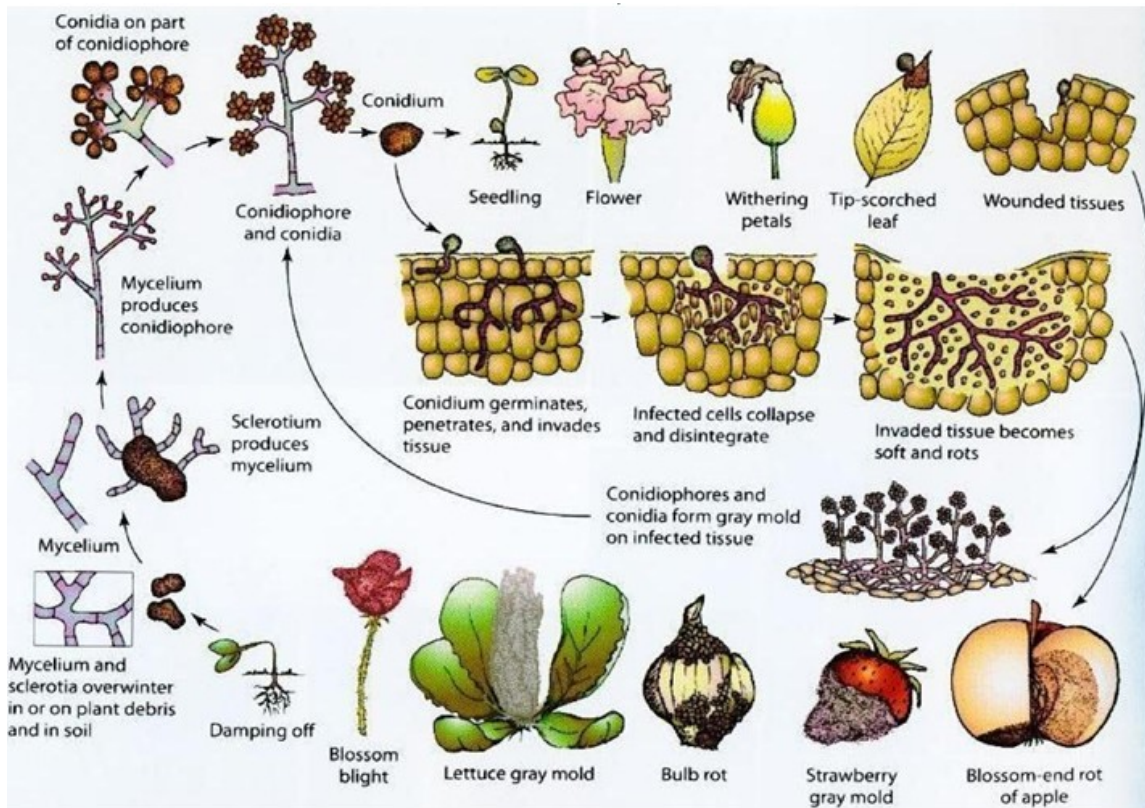


Figure 1 : Cycle de développement de la pourriture grise chez *Botrytis cinerea* (Agrios 2005)

Une autre voie de développement de la pourriture grise qui est très rare, même quasi inexistante en conditions environnementales est la reproduction sexuée. Elle se produit en hiver et est le résultat de la fusion entre les microconidies (spermaties) produites par le mycélium et les gamètes femelles (asques) produits dans les sclérotés. Dans ce cas-ci, le sclérote produit des structures qu'on nomme apothécies qui sont des fructifications sexuées. Tous les détails cellulaires de la plasmogamie ainsi que l'initiation des apothécies n'ont pas encore été décrits dans la littérature. En revanche, les apothécies contiennent les asques qui sont les cellules reproductrices des champignons ascomycètes. Chacune de ces asques contient 8 ascospores haploïdes. Lorsqu'il y a germination, les ascospores produisent un mycélium sur lequel se différencient des conidiophores qui produisent les macroconidies

(Williamson *et al.*, 2007). Une fois l'infection de l'hôte par *Botrytis cinerea* établi, une multitude de symptômes peuvent apparaître.

1.1.3 Symptômes

Avec sa très large gamme d'hôtes, *Botrytis cinerea* est responsable d'un très large spectre de symptômes. Il devient donc difficile de généraliser tous ces symptômes. Les symptômes qui sont les plus typiques pour les feuilles et les petits fruits sont l'apparition de taches brunes, suivies par l'apparition de feutrage grisâtre, qui sont en fait les conidies (Williamson *et al.*, 2007). L'apparition de pourriture causée par *B. cinerea* n'est pas toujours désavantageuse. En effet, sous certaines conditions climatiques, le champignon va causer ce qu'on nomme la pourriture noble qui est responsable de la production de certains des meilleurs vins blancs sucrés au monde. Par contre, pour tenter de gérer cet envahisseur et diminuer les pertes économiques causées par la pourriture grise, déjà plusieurs méthodes sont à la disposition des agriculteurs.

1.2 Lutte contre la pourriture grise

Parmi les différentes méthodes utilisées pour lutter contre la pourriture grise, on retrouve, entre autres, le contrôle via les méthodes biologiques qui consiste en l'utilisation d'organismes vivants, principalement des bactéries ou des champignons non-phytopathogènes, ou l'utilisation de produits issus de ces mêmes organismes. Pour le champignon phytopathogène *B. cinerea*, il existe actuellement le biofongicide SERENADE ASO à base de *Bacillus subtilis* homologué au Canada (SAGE pesticides, www.sagepesticides.qc.ca). Dans la lutte contre la pourriture grise, on retrouve aussi l'adoption de bonnes pratiques culturales via les méthodes prophylactiques comme l'effeuillage, la réduction de la densité des plantes, le retrait de feuilles infectées afin de prévenir ou défavoriser le développement de *B. cinerea* (Ajouz, 2009). Il existe aussi les recherches sur l'amélioration génétique qui restent toujours une option pour la lutte contre la

pourriture grise. Par contre, à l'heure actuelle, il n'existe pas de variétés commerciales résistantes à *B. cinerea*. Finalement, la méthode de lutte la plus utilisée est le contrôle via les méthodes chimiques, c'est-à-dire l'utilisation de fongicides.

1.2.1 Lutte chimique

Afin de combattre les champignons phytopathogènes qui ravagent nos cultures, les méthodes de contrôle chimique sont largement utilisées en agriculture (Leroux *et al.*, 2010). D'ailleurs, ces méthodes demeurent, encore aujourd'hui, la solution la plus efficace pour permettre de réduire les dommages engendrés par la pourriture grise. La technique d'application de composés chimiques la plus fréquemment utilisée jusqu'à aujourd'hui consiste à pulvériser les parties aériennes des plantes avec les fongicides (Elad *et al.*, 2004). Afin de lutter contre la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*, plusieurs familles de fongicides de synthèse sont homologuées au Canada. Ces fongicides sont classés en 5 catégories selon leur mode d'action biochimique sur le champignon phytopathogène : les fongicides affectant 1) la respiration (boscalide, fluopyrame), 2) le fonctionnement des microtubules (benomyle, carbendazime), 3) l'osmorégulation (iprodione, fludioxonile), 4) la biosynthèse de méthionine (cyprodinile, mepanipyrimine) ou 5) la biosynthèse des stérols (fenhexamide, triflumizole) (figure 2) (Leroux *et al.*, 2002).

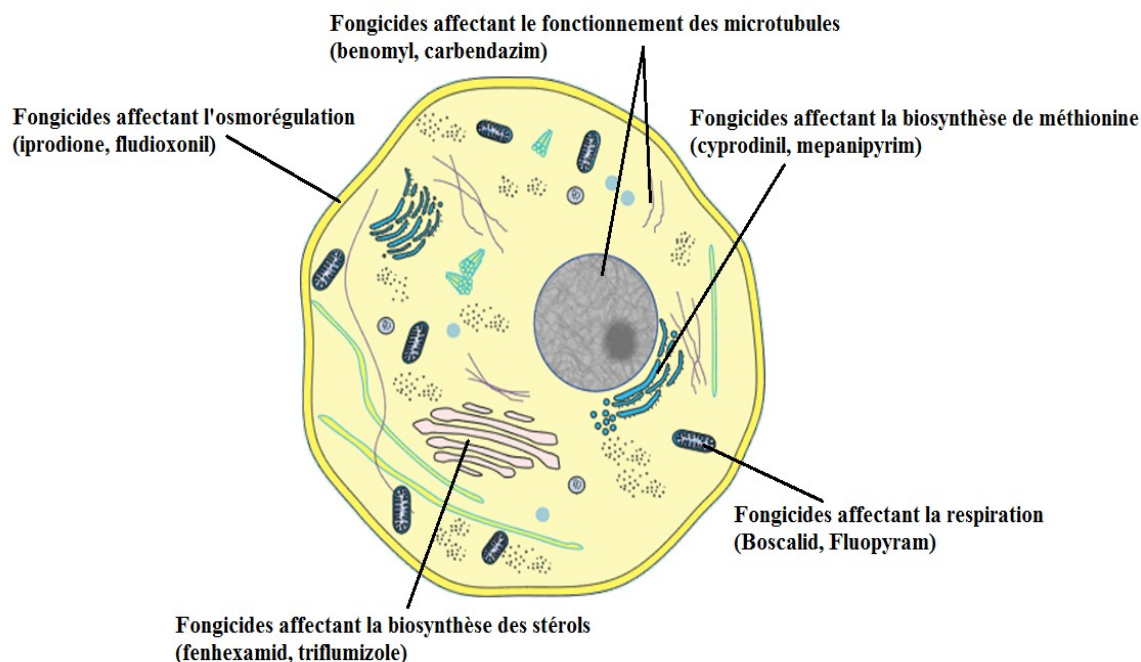


Figure 2 : Sites d'action des fongicides chez *Botrytis cinerea*

Parmi les différents fongicides listés par la Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) (www.frac.info/), ceux se retrouvant dans les catégories d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols ainsi qu'inhibiteurs du coenzyme Q (QoIs, inhibiteurs de la respiration), seraient les deux plus appropriés à utiliser, en terme d'efficacité, pour le contrôle des maladies en agriculture commerciale (Sierotzki et Scalliet, 2013). Cependant, avec l'apparition de la résistance et le manque d'alternatives de lutte, une autre classe de fongicides affectant la respiration, les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (ISDH), occupe une place de plus en plus importante dans le marché de l'agriculture commerciale.

1.2.2 Fongicides affectant la respiration

Depuis peu, l'utilisation de fongicides inhibant la respiration est de plus en plus fréquente et abondante (Leroux *et al.*, 2010). La majorité de ces fongicides ont pour cible deux complexes jouant un rôle dans la respiration mitochondriale soit le complexe du coenzyme

Q, plus précisément le cytochrome b, ou bien le complexe de la succinate déshydrogénase (Leroux *et al.*, 2010). Aujourd'hui, les différents fongicides qui inhibent le complexe de la succinate déshydrogénase (ISDH) compte 17 ingrédients actifs répartis en 6 familles chimiques selon la structure chimique de la partie acide de la molécule (www.frac.info/ ; Lalève *et al.*, 2013). (Tableau 1)

Tableau 1 : Classement des ingrédients actifs inhibant le complexe de la succinate déshydrogénase.

Familles Chimiques	Sous-groupes	Ingrédients Actifs
Pyrazole carboxamides		benzovindiflupyr
		sedaxane
		isopyrazam
		bixafen
		penthiopyrad
		furametpyr
		penflufen
		fluxapyroxad
Oxathiin carboxamides		carboxin
		oxycarboxin
benzamides	Phenyl benzamides	flutolanil
		meppronil
		benodanil
	pyridinyl ethylbenzamides	fluopyram
Thiazole carboxamides		thifluzamide
Pyridine carboxamides		boscalid
Furan carboxamides		fenfuram

Le complexe de la succinate déshydrogénase (SDH), qui peut aussi porter le nom de complexe II ou succinate-ubiquinone oxydoréductase, est le plus petit complexe dans la chaîne respiratoire (Avenot et Michailides, 2010). Le complexe SDH comprend quatre sous-unités dont une flavoprotéine (Fp) de la sous-unité (SdhA) liée de manière covalente à un cofacteur d'oxydo-réduction, la flavine adénine dinucléotide (FAD), une protéine fer-soufre (Ip) de la sous-unité (SdhB), qui contient trois centres fer-soufre, [2Fe-2S], [4Fe-4S] et [3Fe-4S] organisées en une chaîne de transport d'électrons linéaire de FAD à l'ubiquinone. Les deux autres sous-unités (SdhC et SdhD) sont deux protéines membranaires qui forment l'ancrage du complexe enzymatique à la membrane mitochondriale interne (Figure 3) (Avenot et Michailides, 2010 ; Lalève *et al.*, 2013 ; Yin *et al.*, 2011). De plus, le complexe SDH contient aussi un groupe prosthétique hème b qui se situe entre SdhC et SdhD (Avenot et Michailides, 2010).

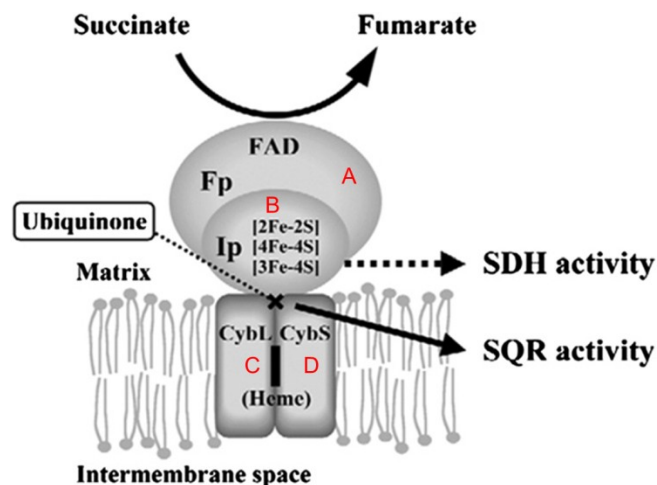


Figure 3 : Complexe de la succinate déshydrogénase (SDH) (Avenot et Michailides, 2010)

Le complexe de la succinate déshydrogénase joue un rôle essentiel dans la voie du transport des électrons dans la mitochondrie ainsi que dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). En effet, le complexe SDH est responsable de l'oxydation du succinate en fumarate suivi du transport des électrons à travers la chaîne de transport de FAD à l'ubiquinone, pour

finalement permettre la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol. Les fongicides inhibiteurs de ce complexe ont tous le même mode action spécifique qui consiste en l'inhibition du cytochrome b560, une sous-unité du complexe II (SDH) dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Veloukas *et al.*, 2013). En effet, les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase agissent spécifiquement en bloquant le site d'attachement à l'ubiquinone. Ce blocage engendre un arrêt du transport d'électrons provenant de la chaîne de transport de la sous-unité B vers l'ubiquinone et donc, un arrêt de la respiration mitochondriale (Avenot et Michailides, 2010).

Un de ces inhibiteurs récemment introduit au Canada en 2003 et fréquemment utilisé est le boscalide (<http://www.hc-sc.gc.ca/> ; Sierotzki et Scalliet, 2013). Aussi connu sous le nom de pyridine carboxamide boscalide [2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl) nicotinamide] (Figure 4), ce composé à large spectre a été introduit afin de contrôler plusieurs champignons appartenant à la famille des ascomycètes dont *B. cinerea* et des basidiomycètes (De Miccolis Angelini *et al.*, 2010). Le boscalide a la particularité d'être un fongicide à site-spécifique, c'est-à-dire qu'il agit à un endroit précis sur le complexe de la succinate déshydrogénase.

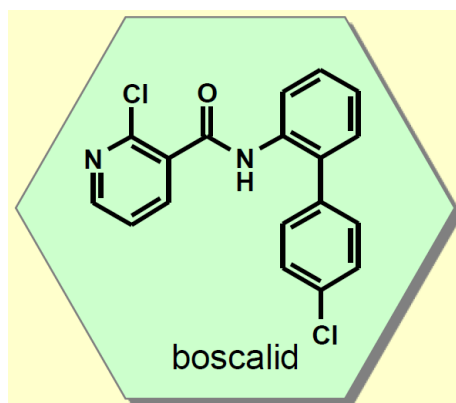


Figure 4 : Structure chimique du boscalide [2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl) nicotinamide] (FRAC, www.frac.info/)

Le boscalide agit à différents stades dans le développement du champignon. Il inhibe la germination des spores (asexuées), inhibe l'élongation des tubes germinatifs, la croissance du mycélium et la sporulation asexuée (De Miccolis Angelini *et al.*, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011). Cependant, même si les fongicides semblent être une option efficace contre les organismes phytopathogènes, certains d'entre eux ont développé des mécanismes de résistance face à ces composés chimiques. D'ailleurs, selon la FRAC (www.frac.info/), les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (ISDHs) sont considérés comme des fongicides ayant un risque moyen à élevé face au développement de la résistance dû à leur mode d'action à site unique.

1.3 Phénomène de résistance

Le phénomène de résistance existe chez la plupart des organismes vivants. Une définition de la résistance est la capacité pour un organisme vivant de se développer en présence de doses de produits toxiques qui inhibent les individus d'une population normale de la même espèce. Lorsque le produit toxique en question est utilisé de façon fréquente et répétitive, ceci favorise l'augmentation de la pression de sélection au sein d'une population et par le fait même, l'augmentation de l'apparition de résistance. En ce qui concerne la résistance aux fongicides, elle se qualifie comme une réduction de la sensibilité du champignon vis-à-vis du fongicide (Ma et Michailides, 2005). Dans le cas de *B. cinerea*, l'utilisation fréquente et répétitive de fongicides contenant du boscalide et la facilité d'adaptation de *B. cinerea* ont fait en sorte de favoriser l'apparition d'individus résistants dans des populations. Jusqu'à maintenant, des souches de *B. cinerea* ont été reportées comme étant résistantes au boscalide dans la vigne, la fraise, la pomme et le kiwi (Bardas *et al.*, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011 ; www.frac.info/).

1.3.1 Mécanismes de résistance chez *Botrytis cinerea*

Les mécanismes de résistance face aux fongicides développés par les champignons ont été intensivement étudiés sur des souches mutantes provenant soit du laboratoire, soit de l'environnement (Avenot et Michailides, 2010 ; Leroux *et al.*, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2013 ; Yin *et al.*, 2011). Dans la plupart des cas, la résistance aux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase est associée à des mutations ponctuelles dans les gènes du complexe SDH qui engendreraient un changement dans la séquence d'acides aminés et par le fait même, une modification au site d'attache du fongicide (De Miccolis Angelini *et al.*, 2010). Des substitutions d'acides aminés provoquées par la mutation d'un ou de plusieurs nucléotides dans les gènes codant pour les sous-unités SdhB et SdhD sont associées à ce type de résistance (De Miccolis Angelini *et al.*, 2010). Plus particulièrement, les mutations associées à la sous-unité B de la protéine fer-soufre (SdhB) seraient responsables de la résistance au boscalide (De Miccolis Angelini *et al.*, 2010). Les mutations les plus fréquentes retrouvées chez les individus résistants à ce fongicide sont la substitution d'une histidine par une tyrosine (H272Y), par une arginine (H272R), ou par une leucine (H272L) au codon 272 de la sous-unité SdhB (Avenot et Michailides, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011 ; Veloukas *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2011). De plus, sur le codon 225, une proline est substituée par une phénylalanine (P225F) et sur le codon 230, une asparagine est substituée par une isoleucine (N230I) (Avenot et Michailides, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011 ; Veloukas *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2011). Récemment, une nouvelle mutation responsable de la résistance au boscalide a été découverte en Italie. Il s'agit d'une substitution de l'histidine par une valine (H272V) sur le codon 272 (De Miccolis Angelini *et al.*, 2014).

Une étude parue récemment indique qu'il existe une relation entre le type de mutation présente sur le gène SDH et l'efficacité de la SDH. En effet, les travaux de Lalève *et al.* (2013) ont démontré que tous les mutants, excepté le mutant H272Y, avaient une diminution de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase par rapport à la souche sauvage. Le paramètre de la respiration mitochondriale a aussi été évalué dans cette même étude et, encore une fois tous les mutants, excepté le mutant H272Y, avait une respiration diminuée par rapport à la souche sauvage. Ces résultats amènent à considérer un autre aspect

intéressant et important dans l'étude du développement de la résistance au boscalide soit la relation entre la valeur adaptative (fitness) et chacune des mutations. Malheureusement, il existe très peu d'études à ce sujet. Les travaux de Kim et Xiao (2011) ont cependant démontré que des isolats de *B. cinerea* sensibles et résistants possédaient des caractéristiques similaires de valeur adaptative et étaient capable d'infecter des plantes hôtes. Quant aux travaux de Lalève et al. (2013), ils suggèrent qu'il pourrait y avoir une pénalité sur la valeur adaptative des isolats possédant une mutation liée à la résistance au boscalide sauf pour le mutant H272Y. Il serait par contre nécessaire d'effectuer d'autres études sur l'influence de la valeur adaptative sur la survie des isolats mutants dans des populations de *B. cinerea*. Dans le même ordre d'idées, des études récentes (Leroux *et al.*, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011 ; Yin *et al.*, 2011), ont mis en évidence qu'il existe des niveaux différents de résistance aux fongicides dans les populations naturelles de *B. cinerea*. Selon une étude réalisée par Yin *et al.* (2011), les isolats de *B. cinerea* résistants au boscalide peuvent être classés selon un facteur de résistance différent. En effet, le rapport EC_{50} d'un isolat résistant sur EC_{50} d'un isolat sensible, donne une valeur de facteur de résistance (FR). La valeur EC_{50} correspond à la concentration de fongicide qui inhibe de moitié la croissance du mycélium ou la germination des conidies. Lorsque ce rapport donne un $FR < 2$, la souche est dite sensible, lorsque la valeur de FR se situe entre 2 et 10, la souche est considérée comme ayant un niveau faible de résistance. En poursuivant sur la même ligne, lorsque la valeur se situe entre 10 et 100, le niveau de résistance est considéré comme modéré et finalement lorsque le FR est > 100 le niveau de résistance est élevé (Leroux *et al.*, 2010 ; Veloukas *et al.*, 2011).

En se basant sur les mêmes études réalisées par l'équipe de Yin *et al.* (2011), des essais ont d'ailleurs été réalisés en ce qui concerne le niveau de résistance au boscalide de *B. cinerea* pour les mutations H272Y et H272R. Les individus possédant la mutation H272Y avaient la plupart du temps un niveau de résistance élevé, le FR étant > 100 , tandis que ceux ayant la mutation H272R sont la plupart du temps modérément résistants avec un FR entre 10 et 100 (Yin *et al.*, 2011). Une autre équipe, celle de Veloukas *et al.* (2013) ont effectué les mêmes tests de résistance, mais cette fois-ci, pour les mutations H272Y/R/L, N230I et P225F. Ils en

sont venus à la conclusion que pour les mutations H272Y/R, qui sont les plus communes, le niveau de résistance au boscalide est généralement modéré. Pour les mutations N230I, P225F et H272L qui sont rarement détectées, les niveaux de résistance varient de modérés pour N230I à très élevés pour P225F et H272L. Ces résultats concordent avec ceux de Leroux *et al.* (2010) un an plus tôt. Toutes ces nouvelles découvertes démontrent à quel point il est important de développer des outils efficaces afin de poursuivre l'étude au niveau des différents polymorphismes (mutations) présents dans les différentes populations de *B. cinerea* et qui prennent de plus en plus d'ampleur dans nos cultures.

1.4 Outils de détection de la résistance aux fongicides chez *Botrytis cinerea*

Pour permettre d'évaluer efficacement le fonctionnement des fongicides au champ et prévenir le développement de résistance dans une population de champignons phytopathogènes vis-à-vis d'un fongicide, la mise au point de programmes de suivi des mutations responsables du développement de résistance est essentielle (Avenot et Michailides, 2010). Afin d'étudier de façon efficace la résistance aux fongicides, il est nécessaire en tout premier lieu, de déterminer la sensibilité de base d'un agent pathogène face à un fongicide (Avenot et Michailides, 2010). Pour parvenir à déterminer cette sensibilité, les méthodes conventionnelles ont été largement utilisées pour différents fongicides et différentes espèces de champignons. De plus, les mécanismes génétiques de résistance étant de plus en plus documentés, plusieurs outils moléculaires ont été développés pour détecter les mutations responsables de la résistance aux fongicides.

1.4.1 Méthodes conventionnelles

Il existe deux méthodes dites conventionnelles pour évaluer la sensibilité de base d'un champignon phytopathogène, aux fongicides. Afin de déterminer le niveau de base de sensibilité au fongicide d'un isolat sensible, la valeur EC_{50} est déterminée. La première méthode, utilisée encore fréquemment aujourd'hui, consiste à effectuer des tests sur la

germination des conidies ainsi que sur la croissance du mycélium en présence du fongicide (Avenot et Michailides, 2010). Ces tests s'effectuent sur milieu de culture gélosé, supplémenté par l'ajout de différentes concentrations de fongicide (Avenot et Michailides, 2010). Ainsi, il est possible de déterminer la dose discriminante de fongicide requise pour distinguer les isolats sensibles des isolats résistants. Quelques auteurs ont utilisé cette méthode afin de déterminer la sensibilité des isolats au boscalide chez *B. cinerea* (Kim et Xiao, 2011 ; Zhang *et al.*, 2007). La deuxième méthode consiste à effectuer des tests sur des plaques de microtitrage contenant du milieu de culture liquide auquel est ajoutée différentes concentrations de fongicide. Cette technique a été utilisée afin d'évaluer la croissance du mycélium chez différents champignons phytopathogènes tels que *B. cinerea*, *B. squamosa*, *Monilinia* spp. et *Sclerotinia sclerotiorum* (Avenot et Michailides, 2010 ; Carisse et Tremblay, 2007 ; Stammler et Speakman, 2006 ; Tremblay *et al.*, 2003). En plus de déterminer la sensibilité de base face à un fongicide, les techniques conventionnelles ont permis de détecter des isolats résistants chez plusieurs agents pathogènes importants (Avenot et Michailides, 2010).

Même si ces méthodes conventionnelles fournissent une bonne mesure du niveau de résistance aux fongicides, elles restent fastidieuses demandant beaucoup de temps pour détecter des individus résistants car elles nécessitent des cultures pures sur lesquelles des tests en pétri ou en milieu liquide doivent être répétées (Michailides et Ma 2005). De plus, les méthodes conventionnelles ne fournissent aucun renseignement au niveau moléculaire, elles ne permettent qu'une caractérisation au niveau du phénotype. Par contre, le développement des techniques moléculaires a permis dans plusieurs cas d'analyser et d'élucider les causes de la résistance (Fraaije *et al.*, 2002 ; Veloukas *et al.*, 2011 ; Ziogas *et al.*, 2009).

1.4.2 Méthodes moléculaires

Les avancées au niveau des techniques de biologie moléculaire et la disponibilité de nouveaux outils et appareils ont permis de développer de nouvelles méthodes d'identification et de détection de la résistance aux fongicides. Ces méthodes sont beaucoup plus rapides que les méthodes conventionnelles, par contre le mécanisme moléculaire de résistance doit être connu (Michailides et Ma, 2005). Les stratégies modernes de gestion des résistances aux fongicides reposent de plus en plus sur la connaissance des polymorphismes mononucléotidiques (SNP) reliés à la résistance aux fongicides. Plusieurs techniques moléculaires comme le PCR de polymorphisme de restriction (PCR-RFLP), le PCR allèle spécifique, le PCR quantitatif et le pyroséquençage ont été développées et utilisées afin d'étudier ces SNPs (Michailides et MA, 2005, Carter H.E. et *al.* 2013).

1.4.2.1 PCR-RFLP

Le principe de base d'un PCR est l'amplification d'un fragment d'ADN connu, à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques, afin d'obtenir plusieurs copies (plusieurs millions) de ce même fragment. Plusieurs essais de détection des mutations reliées à la résistance aux fongicides font appel à la technique du PCR-RFLP. Cette technique est basée sur une amplification d'une portion de l'ADN, où est inclus le site de mutation, suivi d'une analyse par une coupure avec une enzyme de restriction. Cette analyse permet de détecter la présence d'une mutation qui a pour effet d'altérer le site de coupure de l'enzyme (Michailides et Ma, 2005). Cette altération peut être visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplicon digéré. On choisit comme enzyme de restriction, celles qui ont leur site de restriction à l'endroit où est située la mutation. Lorsque le nombre d'échantillons à traiter est peu élevé, cette méthode s'avère rapide et facile à utiliser. Cette technique a d'ailleurs été utilisée pour de nombreuses études sur la résistance aux fongicides. Entre autres, pour détecter les mutations responsables de la résistance aux ISDHs chez *Botrytis cinerea* (Veloukas *et al.*, 2011) et pour détecter celles responsables de la résistance au benzimidazole chez *Botrytis cinerea* (Ziogas *et al.*, 2009). Elle a aussi été utilisée pour étudier la distribution spatiale des différentes mutations dans une population de *B. cinerea* et *B. squamosa*, c'est-à-

dire vérifier si les différentes mutations étaient dispersées de façon uniforme ou non dans une population (Van Der Heyden *et al.*, 2014). Selon les recherches de Van Der Heyden *et al.* (2014) l'échantillonnage d'individus possédant des mutations nécessite un très haut degré de précision. Dans ce sens, un très grand nombre d'échantillons doit être analysé afin d'avoir une meilleure représentation possible d'une population (Van der Heyden *et al.*, 2014). Les techniques moléculaires actuelles telles que le PCR-RFLP permettent de traiter un grand nombre d'échantillons mais le travail peut être laborieux. Donc, la technique PCR-RFLP qui ne nécessite pas de culture, peut être assez avantageuse pour un nombre peu élevé d'échantillons grâce à sa rapidité et son coût peu élevé. Par contre, la technique ne donne aucune information au niveau quantitatif à moins de comptabiliser les résultats obtenus sur gel suite à un très grand nombre d'essais individuels.

1.4.2.2 PCR allèle spécifique

La méthode du PCR allèle spécifique consiste à obtenir un produit PCR spécifique correspondant au SNP (mutation), en utilisant une amorce ayant en son extrémité 3', la base complémentaire correspondant au site de mutation (Gaudet *et al.*, 2003). L'équipe de Yin *et al.* (2011) a d'ailleurs développée cette technique afin de détecter les mutations H272R et H272Y chez *B. cinerea*. Les avantages de cette technique, sont qu'elle n'est pas très coûteuse et permet la détection rapide de la présence ou non des mutations sur gel d'agarose par présence ou absence du produit d'amplification. Par contre, comme pour le PCR-RFLP, aucune information au niveau quantitatif ne peut être obtenue et cette technique reste efficace et pratique à condition d'avoir un nombre d'échantillons peu élevé (Michailides et Ma, 2005).

1.4.2.3 PCR quantitatif (PCR en temps réel)

Le PCR quantitatif est une autre méthode utilisée dans l'étude de la résistance aux fongicides. Il consiste en la détection et la quantification d'amplicons, qui sont directement

proportionnels au signal de fluorescence produit durant la réaction d'amplification (Poitras et Houde, 2002). Les sondes fluorescentes et les agents se liant à l'ADN double brin sont les deux types de produit couramment utilisés pour la quantification d'amplicons par PCR quantitatif. En ce qui concerne les sondes fluorescentes, il y a quatre technologies existantes : l'hydrolyse de sondes (Taqman assay), l'hybridation de deux sondes (HybProbes), les balises moléculaires (Molecular Beacons) et les amorces scorpion (Scorpion primers) (Poitras et Houde, 2002). Pour illustrer la méthode de PCR quantitatif basée sur les sondes fluorescentes, la technologie de l'hydrolyse des sondes sera brièvement décrite. La quantification de l'amplicon se base sur l'hybridation d'une sonde fluorescente sur les amplicons obtenus par PCR à l'aide d'amorces traditionnelles. Le passage de la Taq polymérase sur la sonde provoque le relâchement d'un chromophore fluorescent. La quantité de fluorescence émise est mesurée à chaque cycle et est directement proportionnelle à la quantité de produit PCR généré (Poitras et Houde, 2002 ; Schaad *et al*, 2003). Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage une plus grande spécificité par rapport aux agents se liant à l'ADN. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (Poitras et Houde, 2002). Cette technologie est toutefois moins efficace et moins flexible pour la détection de mutations spécifiques si on la compare à d'autres technologies en temps réel comme le pyroséquençage par exemple. La technologie à tout de même été développée par l'équipe de Billard *et al*. (2011) pour la quantification des mutations responsables de la résistance au fenhexamide chez *B. cinerea*. Ils ont combiné la méthode allèle spécifique et PCR quantitatif en utilisant une amorce allèle spécifique qui se liait à un brin d'ADN au site de mutation et une sonde taqman qui se liait à l'autre brin d'ADN toujours au site de mutation.

En ce qui concerne les agents se liant à l'ADN double brin, la technologie la plus connue est celle du SYBR Green. En effet, lors du processus d'amplification, le SYBR Green, qui est un fluorochrome, se lie à l'ADN double brin et émet une fluorescence. Cette fluorescence est donc proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente dans la réaction (Poitras et

Houde, 2002). Le désavantage majeur de cette technologie est sa faible spécificité comparée aux sondes fluorescentes. Au niveau de la détection et quantification de SNP pour la résistance au fongicide, une technique a été développée en combinant l'allèle spécifique au PCR quantitatif avec l'utilisation du SYBR Green. Dans ce cas-ci, la résistance à la strobilurine chez *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* a été quantifiée pour la mutation G143A (Fraaije *et al.*, 2002). À ce jour, il n'existe pas de techniques de quantification par PCR quantitatif des mutations reliées à la résistance au boscalide chez *B. cinerea*.

1.5 Pyroséquençage

Aujourd'hui, la technologie du séquençage est l'une des plus importantes au niveau du domaine des sciences biologiques. La technologie du pyroséquençage a déjà fait ses preuves dans de nombreux domaines de la science et plusieurs applications lui sont associées (Ronaghi et Elahi, 2002a ; Ronaghi et Elahi, 2002b ; Chowdhury et Chowdhury, 2012). Entre autres, elle est utilisée dans l'identification de bactéries (Jonasson *et al.* 2002), de virus (Gharizadeh *et al.*, 2001) et de champignons (Gharizadeh *et al.* 2004), dans la détection de mutations (Felsberg *et al.*, 2010 ; Trama *et al.*, 2005 ; Vaughn *et al.*, 2011) et dans le génotypage de SNP (Ahmadian *et al.*, 2000 ; Huang et Röder, 2005 ; Silvar *et al.*, 2011). De plus, le pyroséquençage est aussi utilisé dans la quantification d'allèles ou de mutations au niveau d'une population (Andréasson *et al.*, 2006 ; Carter *et al.*, 2013 ; Förster *et al.*, 2012 ; Van de Wouw et Howlett, 2012) et déjà quelques applications de cette méthode existent pour la résistance aux fongicides, par exemple pour la quantification des mutations L240F et E198A liées à la résistance aux méthyle benzimidazole carbamates chez *Pyrenopeziza brassicae* et pour la quantification de la mutation F129L liée à la résistance à la pyraclostrobine chez *Pyrenophora teres* (Carter *et al.*, 2013 ; Semar *et al.*, 2007).

1.5.1 Principe du pyroséquençage

D'une façon généralisée, le pyroséquençage est une méthode de séquençage en temps réel basée sur la détection d'un pyrophosphate relâché durant la synthèse d'ADN (Chowdhury et Chowdhury, 2012 ; Ronaghi, 2001). La réaction contient un mélange de quatre enzymes qui, suite à une cascade enzymatique produit de la lumière visible dont l'intensité est proportionnelle au nombre de nucléotides ajoutés dans le brin d'ADN cible (Gruber *et al.*, 2002; Ronaghi *et al.*, 1998 ; Ronaghi et Elahi, 2002a ; Ronaghi et Elahi, 2002b).

De manière plus détaillée, une amorce de séquençage est hybridée sur un simple brin d'ADN cible préalablement amplifié par PCR. Le tout est ensuite incubé avec les enzymes (ATP sulfurylase, luciférase, apyrase et ADN polymérase) et substrats (luciférine et adénosine 5' phosphosulfate). Les quatre désoxyribonucléotides (dNTPs) sont ajoutés à la réaction séparément et un à la suite de l'autre. Lorsque le nucléotide est complémentaire à la base sur le brin d'ADN cible, il sera incorporé par l'ADN polymérase (klenow polymérase). Cette réaction d'incorporation est accompagnée par le relâchement d'un pyrophosphate (PPi) (Figure 5A), qui par la suite sera converti en ATP par l'ATP sulfurylase en présence d'adénosine 5' phosphosulfate (APS). Cette production d'ATP permet ensuite la conversion de la luciférine en oxyluciférine à l'aide de la luciférase. Cette réaction enzymatique génère un signal lumineux qui sera détecté par un dispositif de couplage de charge (CCD). La lumière générée sera représentée par un pic sur le pyrogramme (Figure 5B). Chaque signal lumineux est proportionnel au nombre de nucléotides incorporés. Par exemple, si la séquence contient 2 nucléotides semblables côte à côte, le pic sur le pyrogramme sera 2 fois plus élevé que s'il y en avait seulement un.

Au fur et à mesure que la réaction se déroule, une autre enzyme entre en jeu, l'apyrase, qui est responsable de dégrader les nucléotides non-incorporés et l'ATP (Figure 5B). Les nucléotides sont ajoutés un à la fois, lorsque l'étape de dégradation est complétée (PyroMark Q24 User manuel p.3-1, 3-2 ; Chowdhury et Chowdhury, 2012 ; Ronaghi et Elahi, 2002a ; Ronaghi et Elahi, 2002b). Étant donné que la séquence de nucléotides ajoutée est connue, il

est possible de déterminer la séquence de l'ADN cible suite à l'analyse du pyrogramme (figure 3C) (Chowdhury et Chowdhury, 2012 ; Pyromark Q24 User manuel p.3-1, 3-2).

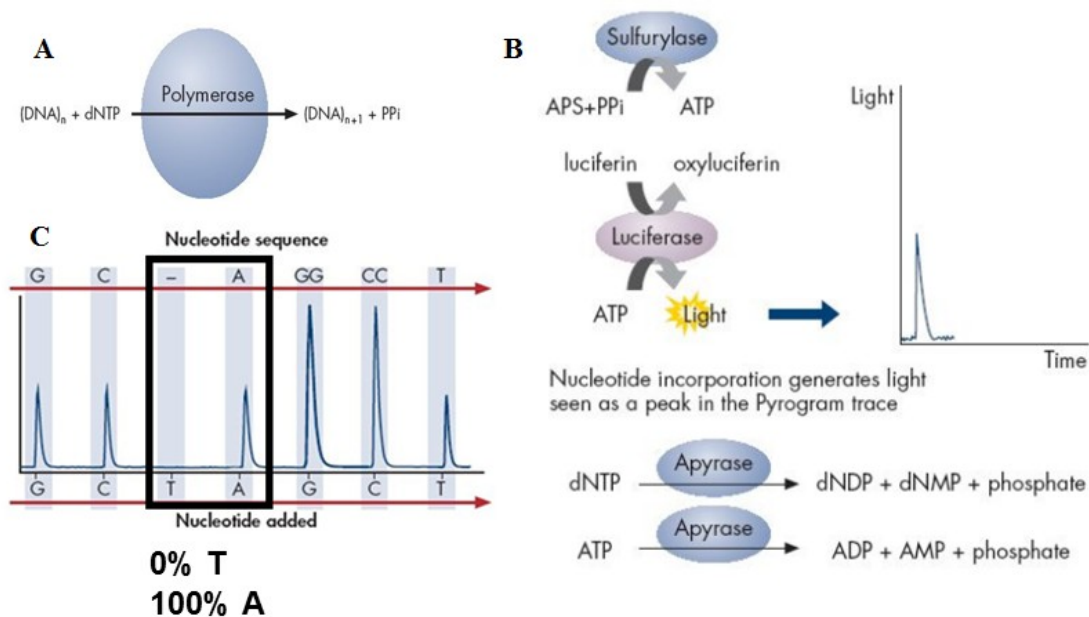


Figure 5 : Principe du pyroséquençage (Qiagen, www.qiagen.com). **A** Incorporation d'un nucléotide au brin d'ADN cible et relâchement d'un pyrophosphate. **B** Conversion du pyrophosphate par l'ATP sulfurase engendrant la conversion de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase générant un signal lumineux. Le signal lumineux proportionnel au nombre de nucléotides ajoutés sera représenté par un pic sur le pyrogramme. L'apyrase dégradera ensuite les nucléotides non-incorporés. **C** Détermination de la séquence de nucléotides à l'aide des pics sur le pyrogramme.

Plusieurs avantages sont associés à l'utilisation de la technique du pyroséquençage. Dans un premier temps, c'est une technique qui s'effectue en temps réel où les incorporations de nucléotides peuvent être observées pour chaque échantillon tout au long du test. La préparation des échantillons est facile et rapide, la programmation d'un test est relativement simple à réaliser et les mutations, délétions ou insertions sont visibles directement sur le

patron de pics du pyrogramme (Chowdhury et Chowdhury, 2012). De plus, les coûts associés à l'utilisation de la technologie du pyroséquençage sont moins élevés que les autres techniques de séquençage existantes. C'est aussi une technique fiable, avec une précision de 5%, qui permet de détecter des SNPs dans une population. Le pyroséquençage est aussi une technique quantitative qui permet de déterminer la fréquence des SNPs au sein d'une population (Pati *et al.*, 2004). Tous ces avantages en font donc une technique de choix pour l'étude quantitative de la résistance aux fongicides. D'ailleurs, afin de contourner les désavantages reliés aux techniques moléculaires utilisées actuellement, Van der Heyden *et al.* (2014) suggèrent qu'une nouvelle méthode de détection permettant d'analyser un mélange d'échantillons et de quantifier les SNPs dans une population soit à considérer. Suite à ces conclusions, la ligne directrice de mon projet de maîtrise s'attardait justement sur le développement d'une méthode d'étude plus efficace par pyroséquençage.

1.6 Objectifs du projet de maîtrise

Avoir un portrait de l'efficacité réelle d'un traitement fongicide est essentiel pour agir d'une manière proactive dans la gestion des stratégies phytosanitaires dans une optique d'agriculture durable et du respect de l'environnement. Cela permet entre autres, d'éliminer les traitements inefficaces de fongicides et de contribuer au ralentissement du phénomène de résistance aux fongicides. Il existe des outils moléculaires pour l'étude de la résistance, mais ils ont leurs limites. Ils ne permettent pas d'analyses quantitatives et un grand nombre d'échantillons ne peut être traité rapidement. L'objectif de ma maîtrise consiste donc à développer une méthode de détection et de quantification de la résistance au fongicide plus efficace que les méthodes moléculaires actuelles par pyroséquençage sur plateforme PyroMark Q24.

Le travail comportait deux sous-objectifs. Dans un premier temps, il s'agissait de mettre au point un nouvel outil de détection et de quantification des mutations reliées à la résistance au boscalide chez le champignon pathogène *B. cinerea* par pyroséquençage sur plateforme

PyroMark Q24 (Qiagen). La mise au point de cet outil s'est effectuée à l'aide d'une banque d'individus de *B. cinerea* génotypés pour la résistance au boscalide et déjà caractérisés par la technique PCR-RFLP, pour la présence des cinq mutations H272Y, H272R, H272L, N230I et P225F.

Dans un deuxième temps, les limites de la méthode ont été analysées en déterminant en premier lieu la précision et la fiabilité des tests, c'est-à-dire l'écart entre les quantités connues des différents mutants et les quantités estimées par l'appareil PyroMark Q24. Pour se faire, les différents tests de pyroséquençage ont été réalisés à l'aide de mélanges d'amplicons préparés à partir de produits PCR de la souche sauvage et des différents mutants (H272Y/R/L, P225F et N230I) dans les proportions variant entre 0-100%. Par la suite, des mélanges de spores ont été préparés à partir de solutions de spores de la souche sauvage et des différents mutants (H272Y/R/L, P225F et N230I) dans les mêmes proportions que pour les mélanges d'amplicons. En deuxième lieu, la limite de détection du PyroMark Q24 a été déterminée à l'aide de dilution allant de 50 000 spores à 1 spore à partir d'une solution de spores contenant un seul mutant des mutants suivants : H272L, H272Y, H272R, P225F ou N230I. L'analyse au pyroséquençage a, par la suite, été effectuée sur ces dilutions.

CHAPITRE 2

A NEW METHOD TO QUANTIFY MUTATIONS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO SDHI-FUNGICIDES IN *BOTRYTIS* SPP. MIXED POPULATIONS

Préambule

Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* est classé 2^{ème} agent pathogène en importance au niveau mondial sur la base de l'aspect économique et scientifique et présente un risque élevé de développer de la résistance aux fongicides. Aujourd'hui, les mécanismes de résistance sont de plus en plus documentés au point de vue génétique et plusieurs mutations responsables de la résistance au boscalide ont été identifiées sur le gène de la succinate déshydrogénase. Les outils moléculaires pour détecter ces mutations ne permettent pas d'analyses quantitatives et un grand nombre d'échantillons ne peut être traité rapidement. L'utilisation du PyroMark Q24 comme outil de détection et de quantification de cinq mutations reliées à la résistance au boscalide (H272R, H272Y, H272L, N230I et P225F) a permis de repousser ces limites. La technique est basée sur le séquençage par synthèse générant des données quantitatives sous forme de proportion avec une précision de 5%. Dans ce projet, deux tests par pyroséquençage ont donc été élaborés, mis au point et validés. Des mélanges de spores d'individus portant une mutation ont été effectués avec des spores sauvages dans différentes proportions (0-100%). Les résultats obtenus suite aux différents mélanges de spores effectués ont démontré une relation linéaire ($R^2=0,99$) entre les ratios connus (0% à 100%) et ceux estimés (0-100%) par le PyroMark Q24. Cette technologie permet d'analyser un grand nombre d'échantillons plus rapidement, avec une meilleure précision, et favorise l'étude populationnelle en offrant la possibilité de combiner plusieurs échantillons. Le PyroMark Q24 est une technologie prometteuse pour mieux comprendre et gérer plus efficacement la problématique de la résistance aux fongicides.

La contribution des auteurs du manuscrit est la suivante. J'ai effectué toutes les expérimentations de cette étude et rédigé cet article. Mathieu Tremblay et Carole Beaulieu ont guidé l'étudiante dans son apprentissage et participé à la rédaction de l'article. Odile Carisse a supervisé l'ensemble des travaux. Hervé Van Der Heyden a aussi contribué à la révision de cet article. Cet article sera soumis au journal '*Pest Management Science*'.

Manuscrit

Tel qu'il sera soumis à *Pest Management Science*.

Title: A new method to quantify mutations associated with resistance to SDHI-fungicides in *Botrytis* spp. mixed populations

Running title: Quantify SDHI-resistant mutations

Author: Mélanie Gobeil-Richard, David-Mathieu Tremblay, Carole Beaulieu, Hervé Van Der Heyden and Odile Carisse

* Corresponding author. Mailing address: centre de recherche et développement en horticulture (CRDH), Agriculture et Agroalimentaire Canada, 430 Boulevard Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada, J3B 3E6. Phone : (450) 515-2023. Fax : (450) 346-7740. E-mail: odile.carisse@agr.gc.ca

Abstract

BACKGROUND

The genetic underlying resistance mechanisms in the population of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* are well documented. Specifically, several mutations associated with SDHIs-based fungicide resistance were identified in the succinate dehydrogenase gene. The objective of this work was to develop a molecular tool for precisely quantifying these mutations within a *Botrytis* population. A test using the PyroMark Q24 instrument was designed to detect and quantify five mutations associated with SDHIs resistance.

RESULTS

The technique is based on sequencing by synthesis and generated quantitative data with an accuracy of 5% and a limit of quantification of a minimum of 500 spores. The results showed a linear relationship ($R^2 = 0.99$) between known and estimated proportions of spores carrying mutations and wild-type strains for ratios of 0%–100%, with 20% increment using the PyroMark Q24.

CONCLUSION

With the pyrosequencing assay developed, a large number of *Botrytis* spp. individuals can be characterized in a timely fashion with greater accuracy than commonly used methods. This technique would also facilitate the study of SDHIs-based fungicide resistance at the population level by offering the possibility of combining samples and by generating quantitative information on the proportion of each mutation present. Hence, pyrosequencing is a promising technology to improved our understanding of fungicide resistance, detect arrival of new mutations, monitor shifts in fungal populations, assess the effectiveness of anti-resistance strategies and for routine monitoring of fungicide resistance.

Key words: PyroMark Q24; pyrosequencing; *Botrytis*; fungicide resistance; SDHI

1 INTRODUCTION

To circumvent the action of fungicides, fungus including *Botrytis* spp. has developed several resistance mechanisms, including single nucleotide polymorphism (SNP), transcriptional regulation, efflux pumps, and increased gene expression. Numerous studies have been conducted with both laboratory and field mutants to identify mechanisms associated with succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs) resistance, especially boscalid.¹⁻⁴ With advances in molecular techniques, those mechanisms are becoming increasingly well documented. Recent studies showed that resistance to SDHIs-based fungicides is caused by single or double point mutations in the subunit B of the succinate dehydrogenase (*SdhB*) gene, resulting in an amino acid change at codon 225, 230, or 272.^{1,3,5} These modifications result in the substitution of the histidine by an arginine (H272R), a tyrosine (H272Y), a leucine (H272L) or a valine (H272V) at codon 272. The asparagine at codon 230 is replaced by an isoleucine (N230I), and at codon 225, a proline is replaced by a phenylalanine (P225F), a threonine (P225T) or a leucine (P225L).²⁻⁵ Another modification in the subunit D of the succinate dehydrogenase (*SdhD*) gene also causes resistance to SDHIs and results in the substitution of the histidine by an arginine (H132R) at codon 132.³

More recently, it has been shown that these mutations have different resistance factors for each SDHI-based fungicide.⁶ For example, in boscalid-resistant populations, *Botrytis cinerea* strains carrying the H272Y, H272R, P225T or N230I mutations are considered moderately resistant, and those with the H272L, P225L or P225F mutations are considered highly resistant.^{3,6} The development of SDHI resistance and the proportion of the different mutations present in a population of *B. cinerea* can therefore greatly affect the effectiveness of a field application of a SDHIs-based fungicide.⁷ In different parts of the world, there is agreement between different surveys conducted in different crops affected by *B. cinerea* that

H272R and H272Y are the most commonly detected mutations in field isolates, whereas the H272L, N230I, and P225F mutations are present but in low proportions.^{2-4,8}

Nowadays, fungicide resistance is a major concern in several crops, including those affected by *B. cinerea*. Various resistance-management strategies have been designed and implemented, mostly at the field level. However, the results of a recent study suggest that resistance management should be implemented at the regional level.⁹ The absence of sampling plans and of cost-effective tools to estimate the proportion of resistant individuals in a population limits the implementation of effective management strategies.¹⁰ Resistance to fungicides could be estimated based on mycelial growth or spore germination on culture media containing different concentrations of the fungicides or a single discriminant dose (one that discriminates between sensitive and resistant isolates). Advances in molecular biology have provided new opportunities for rapidly detecting fungicide-resistant genotypes once the mechanisms of resistance have been elucidated at the molecular level. Regardless of the method used, sampling large populations such as fungal populations implies that the appropriate number of samples is collected. The appropriate number of samples depends on the desired accuracy, the incidence of resistant individuals in the sampled population and on the spatial distribution of resistant individuals. The accuracy is generally determined based on the objective of sampling and on the resources available; in general the accuracy increases (lower coefficient of variation) with increasing sample size. Similarly, for a given accuracy, the number of samples required decreases with increasing incidence and increases with increasing spatial aggregation of the of resistant isolates. The accuracy is generally determined before sampling and incidence is unknown. There is little information in the scientific literature on spatial distribution of fungicide resistant individuals in fungal populations. However, the spatial distribution of *B. cinerea* strains carrying H272R and H272Y mutations associated with SDHI resistance and of both *B. cinerea* and *B. squamosa* strains carrying the I86S mutation associated with dicarboximide resistance was recently studied in a vineyard and in an onion field (*B. squamosa*).¹¹ The observed incidence of these mutations varied from 16 to 68%, with an overall mean of 43%. The frequency of

individuals carrying the different mutations followed a Beta-binomial distribution indicating the presence of local aggregations. Using the index of aggregation derived from this study, sampling curves were computed for different levels of accuracy and incidence of mutations.¹¹ For example, if the incidence of the resistant isolates is 25% and a coefficient of variation of 10% in the estimation is acceptable, 81 and 51 sampling units, each one composed of 10 samples will be required if the aggregation is high or low respectively.¹¹ Consequently, in most situations there is not enough resource to conduct sampling with the appropriate number of samples, resulting in inaccurate estimation of resistance. One solution to this sampling issue is to develop a quantitative method to estimate the proportion of resistant individuals or of individuals carrying various mutations from samples composed of a large mixed population.

Several molecular techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), primer-introduced restriction analysis-PCR (PIRA-PCR), PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), allele-specific PCR, allele-specific real-time PCR, and real-time PCR have been developed to facilitate resistance assessment.^{2,4,11-14} However, none of these molecular techniques allows quantitative analysis of proportions of each mutation in same time and in one test (i.e. express resistance as proportions). Recently, the progress in sequencing technology, specifically pyrosequencing, has made it possible to overcome these limitations. Many laboratories have already adopted this technology for SNP analysis, allele frequency quantification,^{15,16} mutation quantification,¹⁷⁻¹⁹ or identification of fungi²⁰ or bacteria.²¹

The phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. [teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] can infect more than 250 crops and cause significant yield losses.¹ Based on its scientific and economic importance, *B. cinerea* has recently been identified as the second most important plant pathogen worldwide.²² Moreover, because of its high genetic variability, abundant sporulation, and polycyclic reproduction strategy, this plant pathogen is at high risk of developing resistance to fungicides, which makes it a perfect model to study SDHI resistance and why it was chosen a case-study in this study. (www.frac.info).^{2,8}

Furthermore, chemical control still plays an important role in the management of *Botrytis*-induced diseases. Boscalid [2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl) nicotinamide], a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide registered in 2003, is commonly used in many anti-*Botrytis* strategies.⁷

The objective of the study was to develop a pyrosequencing assay based on the sequencing-by-synthesis principle to detect and quantify mutations related to SDHIs resistance in *B. cinerea* populations.²³ In such assay, sequencing is performed using a sample containing a mixture of SNPs, on a short DNA segment where the polymorphic sites are located. The proportion of each SNP present in the sample is expressed as a quantitative signal.^{24,25} Pyrosequencing is an appropriate technology for studying SDHIs resistance in *B. cinerea* population because several mutations located on the same gene are involved. Using this technique as a quantitative tool for studying fungicide resistance would provide reliable data on the proportion of each mutation and thus allow the determination of resistance profile of SDHIs mutations in the studied population.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Botrytis cinerea* strains and cultures

For the development of the assay, four *B. cinerea* strains, previously characterized by Van der Heyden et al. (2014), were used.¹¹ To avoid bacterial contamination, strains were cultured on potato dextrose agar (PDA) plates amended with novobiocin (100 mg l⁻¹). Plates were incubated for 2 to 3 weeks at 25 °C until sporulation. Spores were collected using a dry BBL CultureSwab (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and were preserved in 5% glycerol solution (500 µl) at -20 °C. To obtain single-spore strains, spore suspensions (50 µl) were plated on water agar amended with novobiocin (100 mg l⁻¹). After 24 h, individual spores were transferred onto fresh PDA plates, and the plates were incubated for 3 to 4 weeks at 25 °C. All single-spore strains were characterized previously for boscalid-

resistance mutations using PCR-RFLP by Van der Heyden (2013) and Van der Heyden et al.(2014).^{11,14} Single-spore strains carrying the H272Y/R or N230I mutation and wild-type strains characterized by the absence of mutations related to SDHIs were chosen for further experimentation. Two other strains of *B. cinerea* carrying the H272L and P225F were kindly provided by Dr AS Walker (INRA, UR BIOGER-CPP, Thiverval-Grignon, France).

2.2 DNA extraction

2.2.1 DNA extraction from mycelium

Botrytis cinerea strains were cultured on potato dextrose broth for 3 to 4 days to avoid contamination with agar during the DNA extraction process. The DNA was extracted using the FastDNA™ Kit (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) with some modifications. Before mechanical lysis, mycelium (25 mg) was added to a mixture of CLS-Y solution (800 µl) (MP Biomedicals) and PPS solution (200 µl) (MP Biomedicals). The DNA samples were stored at –20 °C until further PCR analysis.

2.2.2 DNA extraction from spores

Single-spore strains were cultured on PDA for 3 to 4 weeks. Spores were harvested in isopropanol (20 ml) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) using a sterile inoculating loop and then filtered through four layers of cheesecloth. Each solution was adjusted to a concentration of 50 spores µl⁻¹. The DNA was extracted as described by Van der Heyden et al.¹¹ with some modifications: spore suspension (100 µl) was transferred into 2 ml screw-cap micro test tubes containing glass beads (425–600 µm in diameter; 100 mg) (Sigma-Aldrich Canada). Isopropanol was evaporated using a SpeedVac (Fisher Scientific, Nepean, Ontario) for 20 min at 60 °C. Chelex (5%, w/v; 300 µl) was added to each tube and heated at 105 °C for 30 min in a dry bath. The PCR assay was performed immediately after DNA extraction.

2.3 PCR and pyrosequencing design

The primers for PCR and sequencing were designed using the PyroMark Assay Design 2.0 software program (Qiagen, Germantown, MD, États-Unis) based on the *SdhB* gene sequence in *B. cinerea* (GenBank accession number XM001548300.1). For PCR amplification, the primer pair F481 (5'-CATTGGCTTGCTTGTGTATGTT-3') and H272R1b (5'-TGTCCTCGAGCAGTTGAGAA-3') was used to amplify a 481-bp fragment including codons H272, P225, and N230. Only the reverse primer H272R1b was labeled with biotin at the 3' end. The 481-bp fragment of the *SdhB* gene was amplified using SurePRIME DNA polymerase (MP Biomedicals) and primer pair F481/H272R1b. The PCR reactions were performed in a reaction volume of 25 µl containing DNA extraction solution (2 µl), PCR buffer (10X; 3.75 µl), MgCl₂ (25 mM; 1.5 µl), dNTPs (20 mM; 0.5 µl), each primer (10 µM; 0.5 µl of each), bovine serum albumin (20.0 µg µl⁻¹; 0.25 µl), and SurePRIME DNA polymerase (5 U µl⁻¹; 0.25 µl) (MP Biomedicals). The PCR amplification was performed in a SureCycler 8800 thermo cycler (Agilent, La Jolla, CA, USA), and the reaction conditions were as follows: 95 °C for 7 min; then 45 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s; and final extension at 72 °C for 10 min. The sequencing primer H272 S1 (5'-GCATGAGTTTGTACAGATGT-3') was designed to sequence the part of the *SdhB* gene that includes the mutations at codon 272. The sequencing primer P225 N230 S1 (5'-TGCTCGACATCTTGC-3') was designed to sequence the part of the *SdhB* gene that includes the mutations at codons 225 and 230. Both sequencing primers were standard desalted primers.

2.4 Pyrosequencing

To perform pyrosequencing, the PCR products were purified with a PyroMark Q24 vacuum workstation (Qiagen). Purifications were achieved in a final volume of 80 µl containing streptavidin-coated Sepharose beads (2 µl; Qiagen), binding buffer (40 µl; Qiagen), PCR

product (20 μ l), and high-purity water (18 μ l; Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA). The solutions were incubated at room temperature for 10 min on a shaker plate (Discovery Scientific Inc., Kelowna, BC, Canada). The resulting single-stranded biotinylated PCR products were immobilized on streptavidin-coated Sepharose beads and then denatured and washed with the PyroMark Q24 vacuum workstation following the manufacturer's recommendations. To detect H272Y, H272R, and H272L, the nucleotide dispensation order was GTCTAGTCACT, and to detect N230I and P225F, the nucleotide dispensation order was GATCTACTACTGTGATGCAG. The SNP frequencies were determined using the PyroMark Q24 allele quantification (AQ) analysis mode. The A-peak factor was adjusted to 0.86 to analyze H272Y/R/L mutations and to 0.84 to analyze P225F and N230I mutations.

2.5 DNA mixtures for pyrosequencing analysis

All *B. cinerea* strains were amplified individually using primer pair F481/H272R1b. The PCR products were quantified using a 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) with the Agilent DNA 1000 Kit following the manufacturer's protocol and were adjusted to a concentration of 30 ng μ l⁻¹. All DNA mixtures were prepared from PCR products of a wild-type strain and different mutant strains (H272Y/R/L, N230I, or P225F) in proportions of 100/0%, 80/20%, 60/40%, 40/60%, 20/80%, and 0/100% in a final volume of 20 μ l.

2.6 Spore mixtures for pyrosequencing analysis

All spore mixtures were prepared from spore solutions at a concentration of 50 spores μ l⁻¹ in a final volume of 100 μ l. All mixtures were prepared from a wild-type strain and the different mutant strains (H272R/Y/L, N230I, or P225F) in the same proportions used to prepare the PCR product mixtures. Because it is expected that more than two mutations can be present in field samples, additional tests were conducted with mixture of three and five

different strains. Considering the large number of possible ratios (720), only four randomly selected ratios were tested (60% (WT) 20% (H272R) 20% (H272Y), 40% (WT) 30% (H272R) 30% (H272Y), 20% (WT) 40% (H272R) 40% (H272Y) and 20% (H272R) 20% (H272Y) 20% (H272L) 20% (N230I) 20% (P225F)).

2.7 Sensitivity of the *B. cinerea* SDHs PyroMark Q24 assay

To determine the quantification limit of the pyrosequencing assay in terms of the minimum number of spores required to conduct the assay, solutions of 50 000, 20 000, 10 000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 25, 10, 5 and 1 spore of the H272L mutant were prepared in a final volume of 100 µl. Pyrosequencing analysis was then performed on these spore solutions using the procedure described above.

2.8 Specificity of the *B. cinerea* SDHs PyroMark Q24 assay

To test the specificity of the PCR primers used prior to pyrosequencing analysis, the 481-bp fragment of *SdhB* gene was amplified in different fungus species and from 41 unidentified fungus contaminants using primer pair F481/H272R1b. Different *Botrytis* species DNA (*B. aclada*, *B. squamosa*, *B. cinerea*, *B. porri*, *B. elliptica*, *B. ficariarum*, and *B. ranunculi*) were tested. Strains of *B. squamosa* was collected from onion fields from Quebec in 2002 and DNA from strains of *B. aclada*, *B. cinerea*, *B. porri*, *B. elliptica*, *B. ficariarum*, and *B. ranunculi* were kindly provided by Dr. K Seifert (eastern cereal and oilseed research centre, Agriculture and Agri-Food Canada). *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* strains, collected from grapes leaves in Frelishburg Québec, Canada were also tested. Finally, a total of 41 unidentified fungal contaminants isolated from onion field in June and July 2008 were tested. The PCR reactions were performed as described previously in section 2.3. PCR products were electrophoresed on 1.7% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining followed by exposure to UV light.

2.9 Statistical analysis

The reliability of the pyrosequencing assay for determining the proportions of wild types and each of the mutants was based on a linear regression between estimated proportions (\hat{P}) and known proportions (P) as $\hat{P} = \beta_0 + \beta_1 P$. This relationship is a straight line with an intercept (β_0) and a slope (β_1) (SAS software package, version 9.3; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3 RESULTS

3.1 Detection and quantification of SDHI mutations by pyrosequencing

In this study, a 481-bp DNA fragment of the *SdhB* gene containing codons H272, P225, and N230 was amplified with the primer pair F481/H272R1b. The PCR conditions were optimized to obtain a single fragment, and all tests were performed using pure cultures. The PCR products obtained from wild type and resistant strains were mixed as pairs in various proportions from 0%–100% to 100-0%. All samples were analyzed using the PyroMark Q24 software in AQ mode to estimate the percentage of sensitive and resistant individuals in each mixture, based on the measurement of the peak height in each pyrogram. The known percentage of sensitive or resistant individuals was compared with the percentage estimated by pyrosequencing analysis for each boscalid-resistance mutation (Fig. 1). For all experiments, there was a linear relationship between the known percentage and the percentage estimated by pyrosequencing, with $R^2=0.99$ (Fig. 1). Also, there was good agreement between the predicted slope ($\beta_1=0.94$ to 0.99) and the known slope ($\beta_1=1$) (Fig. 1). The intercept (β_0) values varied between 0.21 and 2.92, which suggests that the proportions were slightly overestimated by the PyroMark Q24 (Fig. 1).

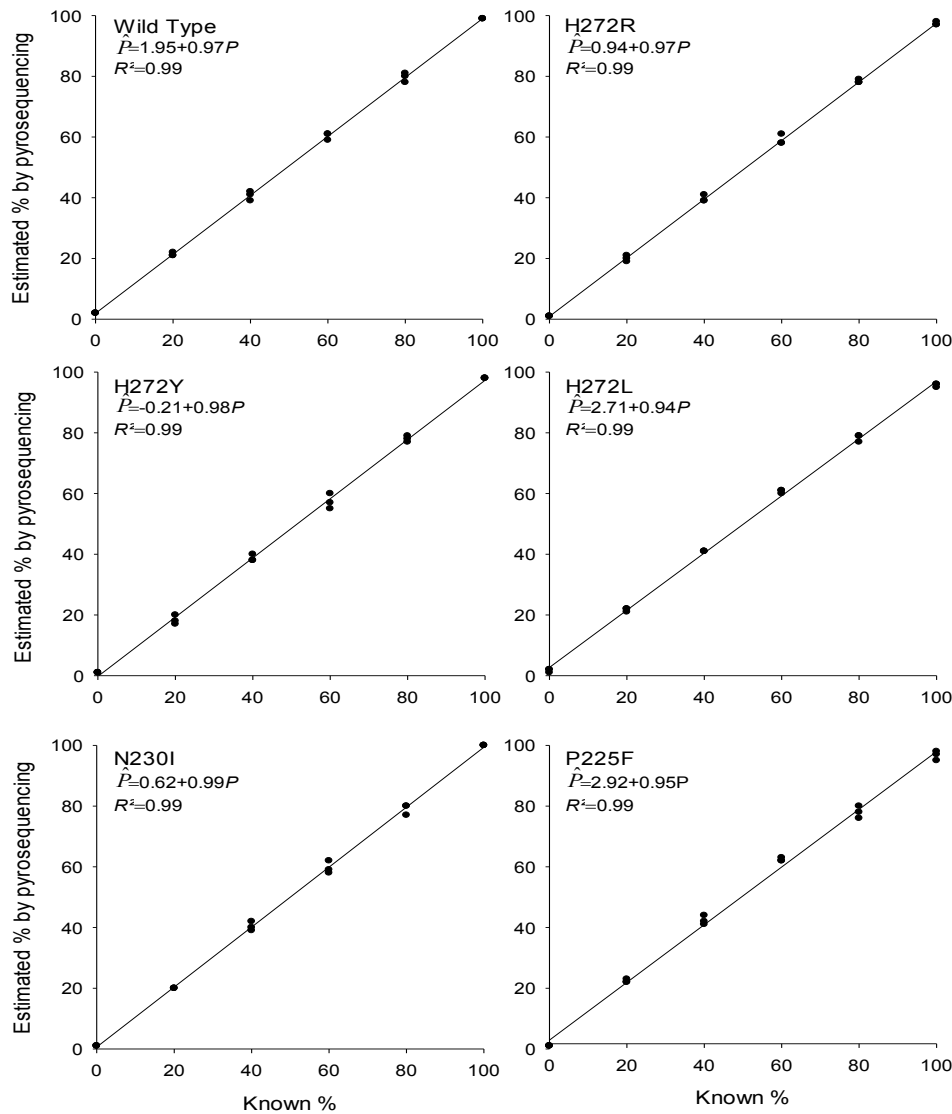


Figure 1. Relationship between the known percentages of wild types and H272R, H272Y, H272L, N230I, and P225F mutants of *Botrytis cinerea* polymerase chain reaction (PCR) products and the estimated percentages of PCR products as determined by pyrosequencing. Polymerase chain reaction products representing sensitive and resistant individuals were mixed in different proportions to give known percentages of each. The percentages of wild types and H272R, H272Y, H272L, N230I, and P225F mutants were estimated by pyrosequencing in AQ (allele quantification) mode.

To test the hypothesis that the pyrosequencing assay could be used with a mixture of spores, different proportions of H272R/Y/L, N230I, and P225F mutations were prepared with spores of *B. cinerea*. The spores from wild type and resistant strains were mixed as pairs in various proportions from 0%–100% to 100-0%. Additional mixes of three and five different strains were also tested. Using the AQ method, the detection and quantification of H272R/Y/L, N230I, and P225F mutations in *B. cinerea* were then performed under the same conditions as for the PCR product mixtures. The DNA extraction was done, followed by PCR amplification of a 481-bp fragment containing the three codons targeted in this study. Thereafter, the analysis was performed using the AQ mode of the PyroMark Q24. For the spore mixtures, as for the PCR product mixtures, there was a linear relationship between the known and estimated percentages of individuals carrying a given mutation, with $R^2=0.99$ (Fig. 2). For the spore mixtures, as for the PCR product mixtures, there was good agreement between the predicted slope ($\beta_1=0.90$ to 0.99) and the known slope ($\beta_1=1$) (Fig. 2). The intercept (β_0) values for the spore mixtures varied between 1.65 and 5.76, suggesting once again that the PyroMark Q24 slightly overestimated the proportions (Fig. 2). Hence, the results clearly show that this technique is reliable for detecting and quantifying resistance to boscalid from spores, as the technique detects and quantifies all possible genotypes in different proportions. The assays were done in triplicate, and the results confirmed that the method is accurate and reproducible.

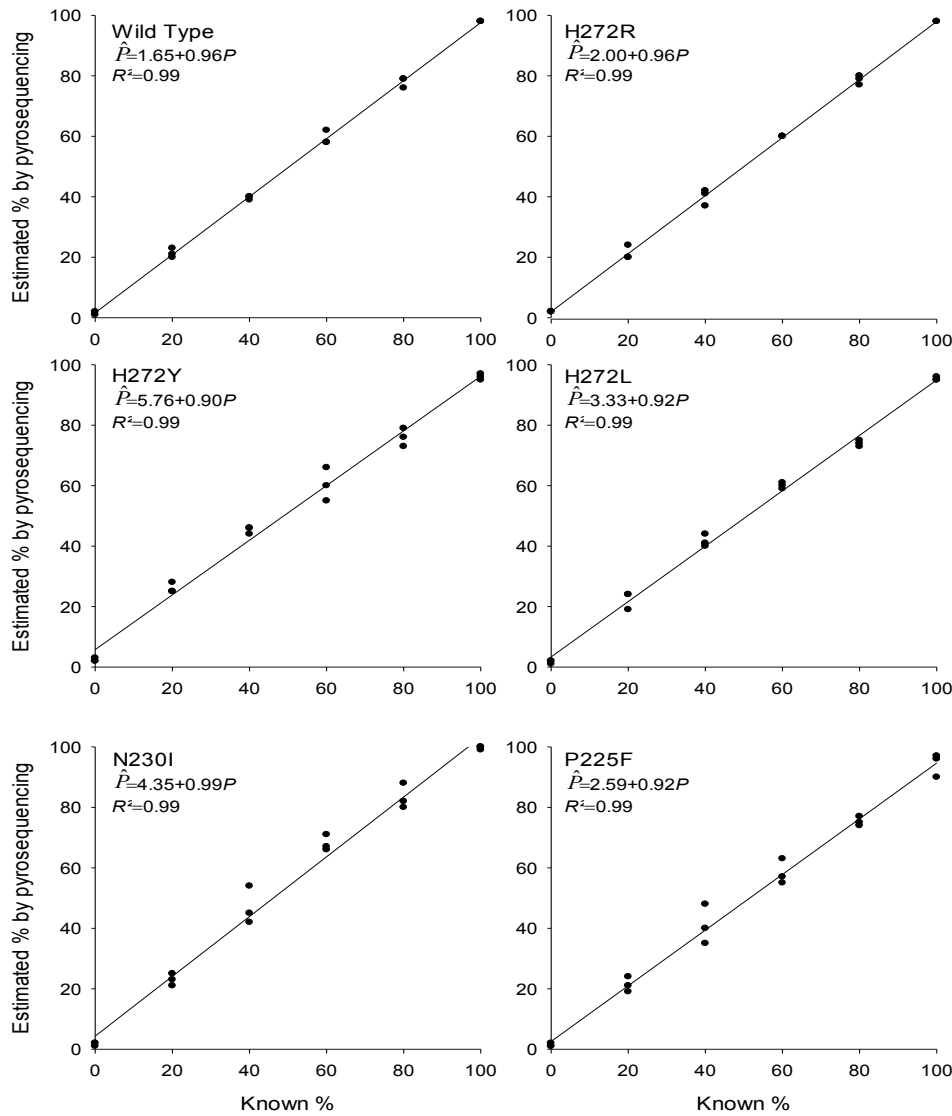


Figure 2. Relationship between the known percentages of wild types and H272R, H272Y, H272L, N230I, and P225F mutants of *Botrytis cinerea* spores and the estimated percentages of spores as determined by pyrosequencing. Spores representing sensitive and resistant individuals were mixed in different proportions to give known percentages of each. The percentages of wild types and H272R, H272Y, H272L, N230I, and P225F mutants were estimated by pyrosequencing in AQ (allele quantification) mode.

3.2 Sensitivity assay

This assay was performed to determine the limit of detection in terms of spore numbers. A series of solutions from 50 000 spores to 1 spore with 100% of the H272L mutation were analyzed in AQ mode. The results showed that the limit of detection of the PyroMark Q24 is 500 spores (Table 1). Below this value, peak heights in the pyrogram are not high enough to satisfy the manufacturer's recommendations. Indeed, below 500 spores the PCR product concentration required for pyrosequencing tests decreases below the manufacturer's recommendations (data not shown). This is due to the limit of PCR amplification with the extraction protocol used in this study. Consequently, the percentage of mutation in a sample and the accuracy of an assay are uncertain below this point. Considering these results, it would be possible to apply pyrosequencing technology to sample fields, since the number of spores picked up using common sampling techniques with swabs is generally above 500.

Table 1. Determination of the limit of detection of the PyroMark Q24 using 100% H272L mutation in AQ (allele quantification) mode				
Number of spores in 100 μ l of solution	% of H272L estimated by pyrosequencing			
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	
1	N/A	N/A	N/A	
5	36	77	18	
10	85	70	43	
25	77	73	91	
50	70	85	93	
100	89	96	91	
500	N/A	96	94	
1 000	97	96	96	
5 000	97	97	97	
10 000	97	97	96	
20 000	97	97	97	
50 000	96	97	96	

N/A: not available

3.3 Specificity assay

This assay was performed to determine the specificity of F481/H272R1b primers. The 481-bp fragment of *SdhB* gene was amplified in different *Botrytis* species, in *Plasmopara viticola*, in *Erysiphe necator* and from 41 unidentified fungus contaminants. All *Botrytis* species tested were positive for the amplification of the 481-bp fragment on agarose gel (Table 2). *P. viticola* and *E. necator* were negative and the 41 unidentified fungus contaminants were also negative on agarose gel (Table 2). The results showed that the fragment of 481 bp of *SdhB* gene studied is conserved between different species of *Botrytis*. It would be possible to use pyrosequencing technology with field samples because it's usually unexpected to find two different species of *Botrytis* in the same field.

Table 2. Specificity of F481/H272R1b primers	
Fungal isolates	Specificity assay
<i>Botrytis aclada</i>	+
<i>Botrytis squamosa</i>	+
<i>Botrytis porri</i>	+
<i>Botrytis cinerea</i>	+
<i>Botrytis ficariarum</i>	+
<i>Botrytis ranunculi</i>	+
<i>Botrytis elliptica</i>	+
<i>Erysiphe necator</i>	-
<i>Plasmopara viticola</i>	-
41 unidentified fungus contaminants	-

(+) positive

(-) negative

4 DISCUSSION

Synthetic fungicides play a major role in plant disease management; however concerns regarding human health (applicator through exposure and consumers through residues), impact on the environment and reduced efficacy due to fungal resistance create a pressure on growers for efficient uses. Amount of fungicide used can be reduced by implementing alternative control methods, such as genetic, cultural, biological and physical methods. In addition, use of fungicide can be avoided when the pathogen is absent or its population small which could be determined based on pathogen or disease monitoring or forecasted risk.^{26,27} Similarly fungicide can be selected based on disease pressure and level of resistance present in the fungal population. Monitoring fungicide resistance is thus crucial for maintaining long term efficacy of disease management programs. Fungicide monitoring could be expensive and not readily available to most growers. In addition to cost, sampling for fungicide resistance implies that a large number of samples must be evaluated or sampling done at the population level rather than the individual level.¹¹ However, when sampling populations, it is necessary to have resistance assessment tools that are quantitative. In other words, there is a need for not only determining if there are resistant individuals in the sampled population but how many are resistant. Considering that most fungicide resistance assessment tools provide binary information (presence or absence of resistant individuals or of mutations) it is possible to reconstruct population by collecting enough data representative of the population. However this approach is time consuming as sufficient numbers of individuals are needed to construct a representative population.

In this study, a resistance assessment tool based on pyrosequencing was developed to provide quantitative information (i.e. proportion of individuals that carry a targeted mutation). Even though applicable to most mutation-based fungicide resistance, it is especially appropriate for SDHI resistance assessments particularly because several mutations are involved. The pyrosequencing assay was developed to detect and quantify five mutations associated with SDHI resistance (H272R/Y/L, N230I, P225L) in *Botrytis* populations. The pyrosequencing technique has several advantages, such as flexibility

regarding the number of different assays that can be performed in a run, reproducibility, very high accuracy and ease of programming (PyroMark Q24 user manual). Because of the ease of programming and analysis of the PyroMark Q24, it will be straightforward to modify the assay to include other mutations located on the same studied gene. For example, by simply reprogramming the sequence to be analyzed in the PyroMark Q24 software without changing the primers, it's possible to include H272V mutation recently discovered in Italy.^{5,28} There are other advantages associated with the use of pyrosequencing instead of PCR-RFLP or allele-specific PCR. Pyrosequencing can handle the analysis of multiple mutations in a single reaction, and can detect resistant individuals that are present in small proportions (5%). More importantly, it has already been shown that pyrosequencing can be used for identifying or quantifying SNP.^{15,16,18,19,29}

With laboratory made *B. cinerea* spore mixtures, the assay was reliable to determine the proportion of both wild type and mutants with a coefficient of variation of 5%. These results suggest that the assay could be used to detect mutations present in low proportions such as mutation N230I or P225F.²⁻⁴ The assay developed in this study could be used for the evaluation of the efficacy of resistance management programs, for investigations following disease control failure and for routine monitoring at the regional, farm, or field levels. Because of the reliability of the assay it could be used to detect shift in the population following the introduction of a new fungicide within the SDHI family. This is especially important for SDHI fungicides as cross resistance has been reported.⁶ Considering cross resistance between fungicides belonging to the SDHI group, it is essential to have both qualitative and quantitative information on each genotype present in a population.⁶ Moreover, resistance to an increasing number of fungicides is developing in populations of fungal plant pathogens, including *B. cinerea*. Thus, the implementation of efficient resistance-management strategies is needed.⁹ However, implementing anti-resistance strategies and evaluating their short- and long-term efficiency require quantification tools for monitoring, especially when several mutations are responsible for the resistance phenotype.

The sensitivity of the assay (minimum of 500 spores) is appropriate for most resistance monitoring programs because in most cases sampling is generally conducted at the end of the growing season, after fungicide selection pressure and for next season decision making. At this time, *Botrytis* populations are large. Also, the developing assay is specific to *Botrytis* at the genus level but not at the species level. Because of the wide and very narrow host range of *B. cinerea* and of other *Botrytis spp*, respectively, this level of specificity is appropriate for most field sampling. Nevertheless, most molecular tests used today, like PCR-RFLP, don't have species specificity and in this study, no signals were obtained for any of the other fungus tested.^{2,6}

Using the assay developed in this study, the analysis of a sample results in a 'resistance profile' for the targeted mutations. Despite the obvious interest of knowing the proportion of each individual carrying these mutations, it raises questions about the interpretation of this 'resistance profile'. First, it should be interpreted in regards of a specific SHDI-based fungicide. For example the H272L mutation is associated with very high resistance factor (>555) for boscalid, moderate resistance factor (38-87) for fluopyram, fluxapyroxad, and carboxim, and low resistance (4.5-8) for isopyrazam, bixafen and fenfuram.⁶ For all fungicide resistance assessments, interpretation of the results in terms of fungicide efficacy (or reduced efficacy) is difficult because proportion of resistant isolates is not proportional to reduced fungicide efficacy. For most fungal plant pathogens, there is no threshold of resistance above which a fungicide is no longer efficient to control the disease. This is accentuated when samples are analyzed with a pyrosequencing assay as the results are highly precise. Nevertheless, the availability of a reliable method of quantification of genetic mutations associated with fungicide resistance open the route for large population analysis for fungicide resistance and for efficient routine resistance monitoring. However it raises questions such as at which proportion of resistant individuals a fungicide is no longer efficient, how many samples should be collected, is sampled could be pooled to reduce the number of samples to process.

Finally, using this technique based on the sequencing-by-synthesis principle, it was possible to generate quantitative data with an accuracy of 5%. Few applications have been developed to quantify SNPs in a spore mixture.^{16,18,30} This pyrosequencing method allows a large number of samples to be analyzed quickly and with high accuracy. Such assay will promote population studies by offering the possibility of combining samples. The application of this new technology could also be considered for detecting and quantifying resistance in *B. cinerea* and other fungal populations to other fungicides, such as fenhexamid, for which many SNPs were identified.¹² The evolution of resistance in a field population is a crucial information for the implementation of fungicide resistance strategies. The possibility of having quantitative data for each of the mutations present in a population is particularly valuable. Indeed, acquiring knowledge on the diversity and frequency of isolates carrying different mutations in a fungal population is of high practical importance, because each mutation has a particular weight in terms of fitness and resistance factors. Pyrosequencing is a promising technology for studying fungicide resistance at the population level, monitoring the dynamics of fungicide resistance, and evaluating the effectiveness of resistance-management actions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Agriculture and Agri-Food Canada and Compagnie de Recherche Phytodata inc. The authors are grateful to Anne-Sophie Walker for kindly providing *Botrytis cinerea* strains H272L and P225F.

REFERENCES

- 1 De Miccolis Angelini RM, Habib W, Rotolo C, Pollastro S and Faretra F, Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana*

(*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *Eur J Plant Pathol* **128**:185–199 (2010).

2 Yin YN, Kim YK and Xiao CL, Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* **101**:986–995 (2011).

3 Leroux P, Gredt M, Leroch M and Walker AS, Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Appl Environ Microbiol* **76**:6615–6630 (2010).

4 Veloukas T, Leroch M, Hahn M and Karaoglanidis GS, Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Dis* **95**:1302–1307 (2011).

5 De Miccolis Angelini RM, Rotolo C, Masiello M, Gerin D, Pollastro S and Faretra F, Occurrence of fungicide resistance in population of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest Manage Sci* DOI 10.1002/ps.3711 (2014)

6 Veloukas T, Markoglou AN and Karaoglanidis GS, Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis* **97**:118–122 (2013).

7 Sierotzki H and Scalliet G, A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* **103**:880–887 (2013).

- 8 Fernández-Ortuño D, Chen F and Schnabel G, Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Dis* **96**:1198–1203 (2012).
- 9 Walker AS, Micoud A, Rémuson F, Grosman J, Gredt M and Leroux P, French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manage Sci* **69**:667–678 (2013).
- 10 Carisse O and Van der Heyden H, Sampling for fungicide resistance, in *Fungicide Resistance in North America*, 2nd edition, ed. by Stevenson KL, McGrath MT and Wyenandt CA. APS Press, St Paul, MN, USA pp. In Press (2014).
- 11 Van der Heyden H, Dutilleul P, Brodeur L and Carisse O, Spatial distribution of single nucleotide polymorphisms related to fungicide resistance and inference for sampling. *Phytopathology* DOI: 10.1094/PHYTO-03-13-0085-R (2014).
- 12 Billard A, Laval V, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Beffa R and Debieu D, The allele-specific probe and primer amplification assay, a new real-time PCR method for fine quantification of single-nucleotide polymorphisms in pooled DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:1063-1068 (2012)
- 13 Fraaije BA, Butters JA, Coelho JM, Jones DR and Hollomon DW, Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol* **51**:45–54 (2002).

- 14 Van der Heyden H, Spatial analysis of fungicide resistance mutations in *Botrytis* spp. populations. MSc thesis, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada, 126 pp. (2013).
- 15 Gruber JD, Colligan PB and Wolford JK, Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum Genet* **110**:395–401 (2002).
- 16 Van de Wouw AP and Howlett BJ, Estimating frequencies of virulent isolates in field populations of a plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*, using high-throughput pyrosequencing. *J Appl Microbiol* **113**:1145–1153 (2012).
- 17 Vaughn CP, ZoBell SD, Furtado LV, Baker CL and Samowitz WS, Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes Cancer* **50**:307–312 (2011).
- 18 Carter HE, Cools HJ, West JS, Shaw MW and Fraaije BA, Detection and molecular characterisation of *Pyrenopeziza brassicae* isolates resistant to methyl benzimidazole carbamates. *Pest Manage Sci* **69**:1040–1048 (2013).
- 19 White HE, Durston VJ, Seller A, Fratter C, Harvey JF and Cross NCP, Accurate detection and quantitation of heteroplasmic mitochondrial point mutations by pyrosequencing. *Genet Test* **9**:190–199 (2005).
- 20 Gharizadeh B, Oggionni M, Zheng B, Akom E, Pourmand N, Ahmadian A, Wallin KL and Nyrén P, Type-specific multiple sequencing primers: A novel strategy for reliable and

rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. *J Mol Diagn* **7**:198–205 (2005).

21 Gharizadeh B, Norberg E, Löffler J, Jalal S, Tollemar J, Einsele H, Klingspor L and Nyrén P, Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing™ technology. *Mycoses* **47**:29–33 (2004).

22 Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD, The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**:414–430 (2012).

23 Fakruddin M and Chowdhury A, Pyrosequencing—An alternative to traditional Sanger sequencing. *Am J Biochem Biotechnol* **8**:14–20 (2012).

24 Ronaghi M, Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* **11**:3–11 (2001).

25 Alderborn A, Kristofferson A and Hammerling U, Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res* **10**:1249–1258 (2000).

26 Van Der Heyden H, Carisse O and Brodeur L, Comparison of monitoring based indicators for initiating fungicide spray programs to control *Botrytis* leaf blight of onion. *Crop Prot* **33**:21–28 (2012).

- 27 Carisse O, Levasseur A and Van Der Heyden H, A new risk indicator for Botrytis leaf blight of onion caused by Botrytis squamosa based on infection efficiency of airborne inoculums. *Plant Pathol* **61**:1154-1164 (2012).
- 28 De Miccolis Angelini RM, Masiello M, Rotolo C, Pollastro S and Faretra F, Molecular characterization and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Manage Sci* DOI 10.1002/ps.3748 (2014)
- 29 Huang XQ and Röder MS, Development of SNP assays for genotyping the puroindoline b gene for grain hardness in wheat using pyrosequencing. *J Agric Food Chem* **53**:2070–2075 (2005).
- 30 Stammer G, Itoh M, Hino I, Watanabe A, Kojima K, Motoyoshi M, Koch A and Haden E, Efficacy of orysastrobin against blast and sheath blight in transplanted rice. *J Pestic Sci* **32**:10–15 (2007).

CHAPITRE 3

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les outils moléculaires ont permis d'approfondir nos connaissances sur la résistance aux fongicides. Ce projet de recherche s'inscrivait justement dans le cadre de travaux visant à développer un nouvel outil moléculaire permettant d'améliorer nos connaissances sur la résistance au boscalide chez le champignon phytopathogène *B. cinerea*. Les résultats ont démontré que la technique de pyroséquençage à l'aide du PyroMark Q24 s'inscrit sans aucun doute dans la lignée d'outils moléculaires permettant la détection de la résistance aux fongicides. Le nouvel outil moléculaire permet non seulement de détecter les différentes mutations liées à la résistance au boscalide, mais en plus fournit une information supplémentaire sous forme quantitative avec une précision de 5%. En effet, la technique du PyroMark Q24 permet de déterminer les proportions des différentes mutations à partir d'un mélange de spores porteuses ou non des mutations, ce qui était impossible jusqu'à maintenant avec les techniques moléculaires existantes. L'acquisition de connaissances sur la diversité et la fréquence des isolats portant différentes mutations dans une population fongique est de grande importance pratique, car chacune de ces mutations a un poids particulier en termes de fitness et de facteur de résistance. La technique du PyroMark Q24 ouvre la porte à une vision globale de la résistance, c'est-à-dire avoir un profil de la population étudiée. D'un point de vue pratique, en considérant les résultats obtenus suite à ce projet de recherche, il serait possible d'appliquer la technique du pyroséquençage comme outil d'étude de l'évolution de la résistance aux fongicides au champ dans une population de *B. cinerea*. En effet, l'utilisation du PyroMark Q24 permettrait de voir l'augmentation ou la diminution des différentes mutations au sein de la population et pourrait aussi permettre d'agir de façon plus efficace sur le contrôle de la maladie. Le test développé pourrait donc être utilisé comme test de routine pour de la surveillance en champs par exemple, ce qui

permettrait entre autres de voir l'évolution de la population au fil de la saison ou même au fil des années. Dans le contexte actuel, où l'impact des fongicides sur la santé et l'environnement sont des sujets sensibles, il est primordial d'avoir un outil permettant d'avoir une information quantitative sur les différentes proportions des mutations au sein d'une population. Cette information servirait d'outil supplémentaire lors de la prise de décision sur l'application de fongicides et donc, l'utilisation inutile de fongicides pourrait ainsi être évitée.

Dans un même ordre d'idées, d'autres tests ont été effectués afin de déterminer la limite de détection du PyroMark Q24 ainsi que la spécificité des amorces utilisés. Ces tests ont été effectués afin de vérifier la possibilité d'appliquer la technique aux échantillons environnementaux. Dans un premier temps, les résultats ont démontré que la limite de détection est de 500 spores et dans un deuxième temps, les tests de spécificité ont permis de conclure que le test est spécifique au niveau de l'espèce, soit *Botrytis* spp. En considérant ces résultats, il serait donc envisageable d'utiliser ce nouvel outil en utilisant des échantillons environnementaux. En effet, la technique actuelle d'échantillonnage au champ s'effectue à l'aide d'un écouvillon, ce qui permet d'amasser beaucoup plus que 500 spores à la fois. De plus, les chances de retrouver deux espèces différentes de *Botrytis* dans la même culture sont presque nulles ce qui ne poserait donc pas de problème lors de l'échantillonnage. D'ailleurs, à court terme, il serait pertinent de valider la technique avec des échantillons environnementaux puisque dans le cadre de ce projet seulement des échantillons de laboratoire ont été utilisés. Ces essais permettraient de valider la précision et la fiabilité des tests développés durant ce projet. Il serait aussi possible de vérifier si les contaminants retrouvés sur les écouvillons pourraient influencer les résultats obtenus par pyroséquençage. De plus, des tests de population seraient nécessaires afin de comparer les résultats obtenus à partir d'échantillons environnementaux individuels ou mélangés. Ces résultats pourraient permettre de vérifier si les proportions de chacun des mutants varient entre les échantillons individuels versus lorsqu'ils sont mélangés.

En somme, la disponibilité de ces nouvelles informations sur la proportion de chacune des mutations qui peuvent se retrouver dans une population, ouvre la porte à bien des questions. Entre autres, toutes les questions concernant l'interprétation de ces résultats, c'est-à-dire, à partir de quel pourcentage doit-on s'inquiéter pour un champ donné, 20%?, 40%?, 60%? Puisque chacune des mutations possède un facteur de résistance différent, l'interprétation des résultats pourrait dépendre de la mutation impliquée, du pourcentage obtenu, du facteur de résistance, du champ étudié et peut-être aussi du fitness? Bref, un volet d'apprentissage sur l'interprétation des résultats est nécessaire avant de pouvoir réellement appliquer ces nouveaux tests à plus grande échelle. Cependant, même avec tous ces questionnements, les avantages du pyroséquençage offrent plusieurs perspectives de recherche. Un aspect à considérer pour le futur, par exemple, est l'utilisation de cette technologie afin de développer d'autres tests pour la détection et la quantification d'autres mutations chez *Botrytis* aussi bien que chez d'autres organismes. L'avenir est donc prometteur pour la technologie du pyroséquençage dans le domaine de la phytopathologie. Les nouvelles informations qu'elle fournirait pourraient résulter en une meilleure compréhension et une meilleure gestion de la problématique de la résistance.

BIBLIOGRAPHIE

- Agrios, G.N., (2005). Plant Pathology (Burlington, MA: Elsevier Academic Press).
- Ajouz, S. (2009). Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides. Ph.D. thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, Avignon.
- Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A.C., Sterky, F., Nyrén, P., Uhlén, M., and Lundeberg, J., (2000). Single-Nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal. Biochem.* 280, 103-110.
- Andréasson, H., Nilsson, M., Budowle, B., Frisk, S., and Allen, M., (2006). Quantification of mtDNA mixtures in forensic evidence material using pyrosequencing. *Int. J. Legal Med.* 120, 383-390.
- Avenot, H.F., and Michailides, T.J., (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 29, 643-651.
- Avenot, H.F., Sellam, A., Karaoglanidis, G., and Michailides, T.J., (2008). Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* 98, 736-742.
- Bardas, G.A., Veloukas, T., Koutita, O., and Karaoglanidis, G.S., (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Manag. Sci.* 66, 967-973.
- Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., and Debieu, D., (2012). Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Manag. Sci.* 68, 684-691.
- Brent, K.J., Hollomon, D.W., (2007). Fungicide Resistance: The Assessment of Risk (Brussels, Belgium: CROPLIFE INTERNATIONAL).
- Carisse, O., and Tremblay, D.M., (2007). Incidence and significance of iprodione-insensitive isolates of *Botrytis squamosa*. *Plant Dis.* 91, 41-46.
- Carter, H.E., Cools, H.J., West, J.S., Shaw, M.W., and Fraaije, B.A., (2013). Detection and molecular characterisation of *Pyrenopeziza brassicae* isolates resistant to methyl benzimidazole carbamates. *Pest Manag. Sci.* 69, 1040-1048.

- Chowdhury, F., and Chowdhury, A., (2012). Pyrosequencing-an alternative to traditional Sanger Sequencing. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 8, 14-20.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Foster, G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414-430.
- De Miccolis Angelini, R.M., Habib, W., Rotolo, C., Pollastro, S., and Faretra, F., (2010). Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *Eur. J. Plant. Pathol.* 128, 185–199.
- De Miccolis Angelini, R.M., Rotolo, C., Masiello, M., Gerin, D., Pollastro, S., and Faretra, F., (2014). Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest Manag. Sci.* DOI 10.1002/ps.3711.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen N., (2004). *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Dordrecht The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Elmer, P. A. G. and T. J. Michailides. (2004). Epidemiology in *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, edited by Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers) 243-272.
- Felsberg, J., Wolter, M., Seul, H., Friedensdorf, B., Göppert, M., Sabel, M.C., and Reifenberger, G., (2010). Rapid and sensitive assessment of the IDH1 and IDH2 mutation status in cerebral gliomas based on DNA pyrosequencing. *Acta. Neuropathol.* 119, 501-507.
- Fernández-Ortuño, D., Chen, F., and Schnabel, G., (2012). Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Dis.* 96, 1198-1203.
- Förster, S., Schumann, E., Weber, W.E., and Pillen, K., (2012). Discrimination of alleles and copy numbers at the Q locus in hexaploid wheat using quantitative pyrosequencing. *Euphytica* 186, 207-218.
- Fraaije, B.A., Butters, J.A., Coelho, J.M., Jones, D.R., and Hollomon, D.W., (2002). Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis f.sp. tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.* 51, 45-54.
- Gaudet, M., Fara, A.G., Beritognolo, I., and Sabatti M., (2009). Allele-specific PCR in SNP genotyping. *Single nucleotide polymorphisms methods and protocols* second edition, Komar, A.A., (Cleveland: Humana Press), pp. 415-424.

- Gharizadeh, B., Kalantari, M., Garcia, C.A., Johansson, B., and Nyrén, P., (2001). Typing of human papillomavirus by Pyrosequencing. *Lab. Invest.* *81*, 673-679.
- Gharizadeh, B., Norberg, E., Löffler, J., Jalal, S., Tollemar, J., Einsele, H., Klingspor, L., and Nyrén, P., (2004). Identification of medically important fungi by the PyrosequencingTM technology. *Mycoses*, *47*, 29–33.
- Gruber, J.D., Colligan, P.B., and Wolford, J.K., (2002). Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using Pyrosequencing. *Hum. Genet.* *110*, 395-401.
- Huang, X.Q., and Röder, M.S., (2005). Development of SNP assays for genotyping the Puroindoline b gene for grain hardness in wheat using pyrosequencing. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 2070-2075.
- Jarvis W.R., (1977) *Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity.* (Harrow, Ontario: Canada department of agriculture).
- Jonasson, J., Olofsson, M., and Monstein, H.J., (2002). Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *APMIS* *110*, 263–72.
- Kim, Y.K., and Xiao, C.L., (2011). Stability and fitness of pyraclostrobin and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* *101*, 1385-1391.
- Kretschmer, M., and Hahn, M., (2008). Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *J. Plant Dis. Prot.* *115*, 214–219.
- Lalève, A., Gamet, S., Walker, A.S., Debieu, D., Toquin, V., and Fillinger, S., (2013). Site directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.12282.
- Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A.S., (2010). Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 6615–6630.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland F., (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest. Manag. Sci.* *58*, 876–888.
- Leroux, P. (2004) Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N, eds. (Dordrecht The Netherlands: Springer) pp. 195–222.

- Ma, Z., and Michailides, T.J., (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* *24*, 853–863.
- Martinez, F., Dubos, B., and Fermaud, M., (2005). The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* *95*, 692-700.
- Pati, N., Schowinsky, V., Kokanovic, O., Magnuson, V., and Ghosh, S., (2004). A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J. Biochem. Biophys. Methods* *60*, 1-12.
- Poitras, E., and Houde, A., (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.* *2*, 2-11
- Ronaghi, M., (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* *11*, 3-11.
- Ronaghi, M., and Elahi, E., (2002a). Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by Pyrosequencing. *Comp. Funct. Genom.* *3*, 51–56.
- Ronaghi, M., and Elahi, E., (2002b). Pyrosequencing for microbial typing. *J. Chromatogr.* *782*, 67–72.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P., (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* *281*, 363–365.
- Schaad, N.W., Frederick, R.D., Shaw, J., Schneider, W.L., Hickson, R., Petrillo, M.D., and Luster, D.G., (2003). Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* *41*, 305–324.
- Semar, M., Strobel, D., Koch, A., Klappach, K., and Stammler, G., (2007). Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L mutation in the cytochrome b gene. *J. Plant Dis. Prot.* *114*, 117-119.
- Sierotzki, H., and Scalliet, G., (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* *103*, 880-887
- Silvar, C., Perovic, D., Casas, A.M., Igartua, E., and Ordon, F., (2011). Development of a cost-effective pyrosequencing approach for SNP genotyping in barley. *Plant Breeding* *130*, 394-397.
- Stammler, G., and Speakman, J., (2006). Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *J. Phytopathol.* *154*, 508–510.

- Trama, J.P., Mordechai, E., and Adelson, M.E., (2005). Detection of *Aspergillus fumigatus* and a mutation that confers reduced susceptibility to itraconazole and posaconazole by Real-Time PCR and Pyrosequencing. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 906–908.
- Tremblay, D.M., Talbot, B.G., and Carisse, O., (2003). Sensitivity of *Botrytis squamosa* to different classes of fungicides. *Plant Dis.* *87*, 573-578.
- Van de Wouw, A.P., and Howlett, B.J., (2012) Estimating frequencies of virulent isolates in field populations of a plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*, using high-throughput pyrosequencing. *Journal of Applied Microbiology* *113*, 1145-1153.
- Van der Heyden, H., Dutilleul, P., Brodeur, L., and Carisse, O., (2014). Spatial distribution of single nucleotide polymorphisms related to fungicide resistance and implications for sampling. *Phytopathology*. in press.
- Vaughn, C.P., ZoBell, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L., and Samowitz, W.S., (2011). Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *GENE CHROMOSOME CANC.* *50*, 307-312.
- Veloukas, T., Lerouch, M., Hahn, M., and Karaoglanidis, G.S., (2011). Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Dis.* *95*, 1302-1307.
- Veloukas, T., Markoglou, A.N., and Karaoglanidis, G.S., (2013). Differential effect of SdhB gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* *97*, 118-122.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Van Kan, J.A.L., (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* *8*, 561–580.
- Yin, Y.N., Kim, Y.K., and Xiao, C.L., (2011). Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* *101*, 986-995.
- Ziogas, B.N., Nikou, D., Markoglou, A.N., Malandrakis, A.A., and Vontas, J., (2009). Identification of a novel point mutation in the β -tubulin gene of *Botrytis cinerea* and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay. *Eur. J. Plant Pathol.* *125*, 97–107.
- Zhang, C.Q., Yuan, S.K., Sun, H.Y., Qi, Z.Q., Zhou, M.G., and Zhu, G.N., (2007). Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathol.* *56*, 646–653.

